

Wirkungen relevanter Zytokine auf Müllersche Radialgliazellen in der embryonalen Hühnchenretina unter normalen und Stressbedingungen

Ein Beitrag zum Verständnis der retinalen
Glioze

vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades
eines Doctor rerum naturalium
genehmigte Dissertation von

Alexander Greif, Master of Science
aus Hagen NRW

Berichtigte Version

Berichterstatter: Prof. Dr. Paul G. Layer
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Galuske

Tag der Einreichung: 01.10.2012
Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2012

Darmstadt 2013
D17

Danksagung

Mein Dank richtet sich an Herrn Prof. Dr. Paul G. Layer, der mir die Möglichkeit gegeben hat in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Außerdem danke ich ihm für sein Diskussionsengagement, viele nützliche Hinweise und Ideen, sowie sein immerwährendes, konstruktives Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Galuske, Herrn Prof. Dr. Gerhard Thiel und Frau Prof. Dr. Schmitz danke ich für die Übernahme des Koreferats. Vielen Dank.

Bei der Anfertigung solch einer Arbeit ist das Arbeitsumfeld von besonderer Bedeutung. Ich hatte das Glück in einer Arbeitsgruppe zu promovieren, die von gegenseitiger Unterstützung, Hilfsbereitschaft und Interesse geprägt war. Dafür möchte ich den Mitgliedern danken. Danke für viel Spaß und Freude auf der Arbeit. Insbesondere gilt mein Dank:

Wolfgang Schäfer: Danke für die vielen lustigen Gespräche und dafür, dass man sich mit jedem Problem an dich wenden konnte und du stets bereit warst konstruktiv zu helfen.

Jutta Huhn: Danke dafür, dass du immer ein offenes Ohr für mich hattest und für die Durchsicht meiner Arbeit.

Meike Stotz-Reimers: Auch dir danke ich für deine Hilfsbereitschaft und deine Unterstützung.

Gopenath Thangaraj: I want to thank you for a lot of interesting and helpful discussions and also for good ideas and impulses.

Julia Wiedemann und Jeanette Christophel danke ich für die Unterstützung bei meiner Forschung, lustigen und ernsten Gesprächen, sowie für spaßige Mittagspausen beim Sushi (danke auch an Oseki für viel Nervennahrung ☺).

Ich danke meinen Eltern, Bernd und Gisela Greif, sowie meiner Oma, Gisela Konradt, für ihre Unterstützung und ihr Engagement, die mich nicht nur die vier Jahre, sondern mein ganzes Leben begleitet haben.

Auch möchte ich den Eltern meiner Freundin, Gerd und Doris Gutowski, und der Schwester meiner Freundin, Christine Gutowski, für ihr Interesse und ihre Anteilnahme meinen Dank aussprechen.

Zum Schluss danke ich meiner Freundin Michaela Gutowski für ihre immerwährende Unterstützung vor, während und nach der Anfertigung dieser Arbeit.

Inhalt

Danksagung	II
Inhalt	IV
Abkürzungsverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis	XII
Tabellenverzeichnis	XV
1 Einleitung	1
1.1 Die Retina des Huhns als Modellsystem	1
1.2 Entwicklung des Auges und der Hühnerretina	1
1.3 Die Eingangs- und Ausgangsneuronen der Retina	4
1.3.1 Photorezeptoren	5
1.3.2 Ganglienzellen	5
1.4 Müllerzellen – die Radialgliazellen als zentrale Vermittler in der normalen wie auch erkrankten Retina	6
1.4.1 DL- α -Aminoadipat wirkt toxisch auf Radialgliazellen (MCs)	8
1.5 3D-Kultursysteme	11
1.6 Neurotrophe Faktoren	14
1.6.1 <i>Brain derived neurotrophic factor</i> (BDNF)	15
1.6.2 <i>Pigment epithelium-derived factor</i> (PEDF)	17
1.6.3 <i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i> (GDNF)	20
2 Zielsetzung	23
3 Materialien und Methoden	25
3.1 Materialien	25
3.1.1 Chemikalien	25
3.1.2 Aggregationsmedium und –Zusätze	26
3.1.3 Zusammensetzung der Medien und Pufferlösungen	26
3.1.4 Wachstumsfaktoren	28
3.1.5 Antikörper	28
3.1.6 Enzyme	29
3.1.7 Primer	29
3.1.8 Reaktionsansätze / Kits	30
3.1.9 Allgemeine Verbrauchsmaterialien	30
3.1.10 Geräte	31
3.1.11 Software	32
3.1.12 Versuchstiere	32

3.2	Methoden	33
3.2.1	Lagerung und Bebrütung der Eier	33
3.2.2	Präparation embryonaler Augen	33
3.2.3	Herstellung von Rosettensphäroiden (Huhn)	33
3.2.4	Ansetzen der Rosettensphäroid-Kulturen	34
3.2.5	Explantat-Kultur	35
3.2.6	Herstellung von Müllerzell-Monolayer in Kulturflaschen und auf <i>cover slips</i>	36
3.2.7	Gewinnung von Müllerzell-konditioniertem Medium	37
3.2.8	Passage von Müllerzellen	37
3.2.9	Herstellen von Stratosphäroiden	38
3.2.10	Zellfixierung auf <i>cover slips</i> und 3D-Kulturen und Herstellung von Gefrierschnitten	39
3.2.10.1	Fixieren von <i>cover slips</i>	39
3.2.10.2	Fixierung von embryonalen Augen für Gefrierschnitte	39
3.2.10.3	Fixieren von Stratosphäroiden, Rosettensphäroiden und Explantaten für Gefrierschnitte	40
3.2.10.4	Herstellung von Horizontalschnitten embryonaler Retina	40
3.2.10.5	Herstellung von Gefrierschnitten von Rosettensphäroiden	41
3.2.10.6	Herstellung von Explantat-Gefrierschnitten	41
3.2.11	Immunhistochemische Färbungen	42
3.2.12	Zellkernfärbung mit DAPI	45
3.2.13	Proliferationsnachweis mittels BrdU-Inkorporationsstudien	45
3.2.14	Zelltod-Detektion mit Hilfe des TUNEL-Test	46
3.2.15	Karnovsky-Roots-Färbung	46
3.2.16	Statistische Analyse von mikroskopisch erfaßten Bildern mit ImageJ	48
3.2.16.1	Statistischer Vergleich von Fluoreszenzfärbungen	48
3.2.16.2	Statistische Messung von Sphäroidflächen	49
3.2.16.3	Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben	50
3.2.17	Molekularbiologische Methoden	50
3.2.17.1	Ernten von Rosettensphäroiden für RNA-Isolierung	50
3.2.17.2	Isolierung der Gesamt RNA	50
3.2.17.3	Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA	52
3.2.17.4	cDNA-Synthese	52
3.2.17.5	PCR-Amplifikation	53
3.2.17.6	Auswertung vor Agarosegelen mit ImageJ	55

3.2.18	Katalase-Test	56
3.2.19	Sterilisation von Medien und Glaswaren	58
4	Ergebnisse	59
4.1	Zellkultursysteme	59
4.1.1	Reifung von Müllerzellen und Photorezeptoren im Explantatsystem	59
4.1.2	Expressionsmuster relevanter Gene während der retinalen Entwicklung im Explantat	61
4.1.3	Erstellen von reinen Müllerzell-Populationen durch Ascorbat	63
4.1.4	Stressinduktion durch Ascorbat im 3D-Kultursystem	65
4.1.5	Die Expression von Wachstumsfaktoren und Rezeptoren in Müllerzellen	69
4.2	Loss-of-function-Analysen von Müllerzellfunktionen durch DL-α-Aminoadipat (AAA)	71
4.2.1	Konzentrationsabhängige Wirkung von Aminoadipat (AAA) auf Sphäroide und Explantate	71
4.2.2	Aminoadipat (AAA) wirkt stärker auf apikale als auf basale Strukturen	74
4.2.3	Fortgeschrittene Aminoadipat (AAA)-Gliose führt zum Absterben der Müllerzellen	78
4.2.4	Zeitabhängige Wirkung von AAA im Explantatsystem	80
4.2.5	<i>Layer of Chievitz</i> wird nicht durch AAA erzeugt	82
4.2.6	Aminoadipat (AAA) erzeugt oxidativen Stress, welcher zur Müllerzell-Gliose führt	83
4.2.6.1	Auch hohe Ascorbat-Konzentrationen erzeugen oxidativen Stress	85
4.2.7	GFAP-Expression wird durch AAA ausgelöst	86
4.2.8	Veränderung der Expressionsmuster relevanter Gene durch Aminoadipat (AAA)	88
4.2.8.1	Reaktion einer reinen Müllerzell-Population auf Aminoadipat	88
4.2.9	Veränderte Expression von Wachstumsfaktoren unter dem Einfluss von Aminoadipat (AAA)	89
4.3	Kann eine Gliose durch Wachstumsfaktoren abgewendet werden?	92
4.3.1	Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Entwicklung der Retina im Explantatsystem	92
4.3.1.1	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i> (GDNF) beschleunigt die Entwicklung von Stäbchen, aber nicht von Zapfen	93
4.3.1.2	GDNF fördert nicht die IPL-Entwicklung	95

4.3.1.3	GDNF und BDNF stimulieren die mRNA-Expression von Glutaminsynthetase (GS) in reine Müllerzell-Populationen	96
4.3.1.4	Beeinflussen Wachstumsfaktoren die Genexpression in Müllerzellen?	97
4.3.2	Wachstumsfaktoren und ihre Wirkung auf die AAA-Gliose	101
4.3.2.1	BDNF und GDNF schützen nicht gegen die Gliose	101
4.3.2.2	PEDF reduziert die AAA-Gliose in Müllerzellen	103
4.3.2.3	PEDF wirkt dem Verlust der IPL-Subbanden durch AAA entgegen	106
4.3.2.4	PEDF kann seine eigene Expression unter AAA-Einfluss nicht stimulieren	107
4.3.2.5	PEDF reduziert die AAA stimulierte GFAP-Expression im Explantat.	109
4.3.2.6	Auch bei späterer AAA-Behandlung reduziert PEDF die Gliose	110
4.3.2.7	PEDF reduziert den oxidativen Stress von AAA im Explantat	111
5	Diskussion	114
5.1	Zellkulturtechniken	114
5.1.1	Retinale Entwicklung und die Expression relevanter Gene im Explantat	114
5.1.2	Auf welchem Weg übt Ascorbat eine neurotoxische Wirkung aus?	116
5.1.2.1	Selektive Wirkung von hohen Ascorbat-Konzentrationen auf 3D-Kultursysteme	118
5.1.3	Können relevante Zytokine auf Müllerzellen wirken?	119
5.1.4	Die Entwicklung der Müllerzellen ist abhängig von Photorezeptoren	120
5.2	Wie wirkt AAA auf retinales Gewebe?	122
5.2.1	Konzentrationsabhängige Wirkung von AAA	122
5.2.2	Wirkt AAA auf sämtliche Entwicklungsstadien gleich?	123
5.2.3	Warum reagieren apikale retinale Strukturen stärker auf AAA?	123
5.2.4	Wie wirkt α -Aminoadipat (AAA) auf die Genexpression relevanter Gene?	125
5.2.5	Was kennzeichnet eine Gliose in der Retina und welchen Zusammenhang gibt es zu α -Aminoadipat (AAA)?	126
5.2.6	Wie erzeugt DL- α -Aminoadipat (AAA) eine Gliose in Müllerzellen?	128
5.3	Die Wirkung von Wachstumsfaktoren auf Explantate und auf das α-Aminoadipat (AAA)-Gliosemodell	131

5.3.1	Allgemeine Wirkung von relevanten neurotrophen Faktoren auf die Entwicklung der gesamten Retina	131
5.3.1.1	Wirkung von relevanten Faktoren auf die Entwicklung der Photorezeptoren	131
5.3.1.2	Nur BDNF beschleunigt die gesamte retinale Explantat-Entwicklung	134
5.3.1.3	Beeinflussen Wachstumsfaktoren das Expressionsmuster in Müllerzellen?	135
5.3.2	Helfen Wachstumsfaktoren gegen die α -Aminoadipat-(AAA)-Gliose?	137
5.3.2.1	PEDF reduziert die α -Aminoadipat (AAA)-Gliose in histologischen Befunden	137
5.3.2.2	Normale GFAP-Expression im α -Aminoadipat-(AAA)-Gliosemodell durch PEDF	139
5.3.2.3	PEDF verringert die stark gliatoxischen Eigenschaften von α -Aminoadipat (AAA) auch bei späterer AAA-Behandlung.	139
5.3.2.4	PEDF reduziert den oxidativen Stress bei der α -Aminoadipat-(AAA)-Gliose	139
Zusammenfassung		141
Literatur		143
Veröffentlichungen		164
Lebenslauf		165
Eidesstattliche Erklärung		166

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
A1	Absorption zum Zeitpunkt t_1
A2	Absorption zum Zeitpunkt t_2
AAA	Aminoadipat (<i>amino adipic acid</i>)
Abb.	Abbildung
AChE	Acetylcholinesterase
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BChE	Butyrylcholinesterase
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin (5-Bromo-2'-Deoxyuridine)
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
bzw.	beziehungsweise
$C_6H_5Na_3O_7$	Natriumcitrat
$CaCl_2$	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
ChAT	Cholinacetyltransferase
cm	Zentimeter
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CO_2	Kohlendioxid
c-Ret	Rezeptor Tyrosin Kinase
CS	Hühnerserum (chicken serum)
$CuSO_4$	Kupfersulfat
Cy2	Carbocyanin 2
Cy3	Carbocyanin 3
DAPI	4, 6-Diamidin-2-phenylindoldihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEPC- H_2O	Diethylpyrocarbonat-behandeltes Wasser
DEPC-PBS	Diethylpyrocarbonat-behandeltes PBS
div	Tage <i>in vitro</i> (<i>days in vitro</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleacid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dT	Desoxythymidin
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylendinitrotetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
et al.	und andere
etc.	et cetera
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GCL	Ganglienzellschicht (<i>ganglion cell layer</i>)

GDNF	<i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GFL	<i>glial cell line-derived neurotrophic factor family ligand</i>
GFR α	<i>GDNF family receptor α</i>
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
GS	Glutaminsynthetase
GSH	Glutathion
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCl	Salzsäure
i. A.	Im Allgemeinen
IG	Immunglobulin
ILM	Innere limitierende Membran (<i>inner limiting membrane</i>)
INL	Innere nukleäre Schicht (<i>inner nuclear layer</i>)
IPL	innere plexiforme Schicht (<i>inner plexiform layer</i>)
IS	inneres Segment
k	Geschwindigkeitskonstante
K ₃ Fe(CN) ₆	Kaliumhexacyanoferrat(III)
kDa	kilo Dalton
KH ₂ HPO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LOC	<i>Layer of Chievitz</i>
Lsg.	Lösung
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MEK	<i>mitogen-activated protein-kinase</i>
mg	Milligramm
min	Minute
MK	Monoklonal
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mRNA	Boten RNA (<i>messenger RNA</i>)
Na ₂ HCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OFL	Optische Faserschicht (<i>optic fibre layer</i>)
Oligo-dT	Oligodesoxythymidin
OLM	äußere limitierende Membran (<i>outer limiting membrane</i>)
ONL	äußere nukleäre Schicht (<i>outer nuclear layer</i>)
OPL	äußere plexiforme Schicht (<i>outer plexiform layer</i>)
OS	äußeres Segment (<i>outer segment</i>)
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered salt solution)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEDF	<i>pigment epithelium-derived neurotrophic factor</i>
PFA	Paraformaldehyd

pH	<i>pH</i>
PI3	Phosphoinositid-3
PI3-k	Phosphoinositid-3-Kinasen
PK	polyklonal
PKC	Proteinkinase C
PLC	phospholipase C
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
ROI	<i>region of interest</i>
RPE	retinales Pigmentepitel
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR (<i>reverse transcription-PCR</i>)
SACs	starburst amacrine cells
sek	Sekunden
SD	Standardabweichung
o.g.	oben genannt
s.o.	siehe oben
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq-Polymerase	DNA-abhängige DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TGF- β	Transforming Growth Factor
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TrkB	tropomyosin related kinase B
TUNEL	Tdt-vermittelte-dUTP-Einzelstrangbruch-Markierung
U	Unit
U/ μ g	Units pro Mikrogramm
U/ μ l	Units pro Mikroliter
UV-Licht	ultraviolettes-Licht
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VIS-Licht	Sichtbares- (<i>visible</i>)-Licht
ZNS	Zentrales Nervensystem
Δt	Zeitraum zwischen t_1 und t_2
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer

Abbildungsverzeichnis

Einleitung

Abbildung 1.	Struktur der Retina im Querschnitt.	3
Abbildung 2.	Golgi-Färbung einer Hühner-Müllerzelle von Cajal 1892.	6
Abbildung 3.	Strukturformel von Aminoacidipat und Glutamat im Vergleich	8
Abbildung 4.	Schematische Darstellung der Entstehung von oxidativem Stress durch DL- α -Aminoacidipat (AAA) in Müller-Gliazellen.	9
Abbildung 5.	Immunhistochemisch gefärbte Kryoschnitte einer E17 <i>in vivo</i> -Retina (a), eines div17 Explantats (b) und eines div8 Sphäroids (c, c').	13
Abbildung 6.	BDNF fördern die IPL- und OPL-Entwicklung, aber nur in Kombination mit Forskolin wird auch die Photorezeptor-Entwicklung gefördert.	16
Abbildung 7.	PEDF verzögert die Entwicklung der Stäbchen-Photorezeptoren zeigt aber keine Auswirkungen auf die IPL-Entwicklung.	20
Abbildung 8.	Schematische Darstellung der GDNF- <i>family ligands</i> und Rezeptor-Interaktionen.	22

Materialien und Methoden

Abbildung 9.	Schematische Darstellung des Verfahrens zur Herstellung von Explantaten aus einem E6-Hühnerembryo.	36
Abbildung 10.	Darstellung von Stratosphäroiden.	39
Abbildung 11.	Schematische Darstellung einer Antikörper-Doppelfärbung.	43
Abbildung 12.	Reaktionsabfolge der Karnovsky-Roots-Färbung.	47
Abbildung 13.	Schematische Darstellung eines typischen PCR-Programmes.	53

Ergebnisse

Abbildung 14	Müllerzellentwicklung <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> im Vergleich.	60
Abbildung 15.	mRNA-Expression verschiedener Gene der Retina <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> .	62
Abbildung 16.	Müllerzellisolierung mit hohen Ascorbat-Konzentrationen.	64
Abbildung 17.	Neuronen-Reinheit der Müllerzell-Monolayer.	65
Abbildung 18.	Neuronen sterben unter dem Einfluss von 2 mM Ascorbat, während Müllerzellen sich in einem Kern des Sphäroids zusammenziehen.	66
Abbildung 19.	Konzentrations- und Zeit-Abhängigkeit des Ascorbat-Effektes.	67

Abbildung 20.	Ascorbat wirkt zuerst nur auf Neuronen des äußeren Gewebebereichs, während die IPL intakt bleibt.	69
Abbildung 21.	mRNA-Expression verschiedener Gene in Müllerzellen im Vergleich zur E6 und E10 <i>in vivo</i> Retina.	70
Abbildung 22.	Reaktion von Rosettensphäroiden auf unterschiedliche AAA-Konzentrationen.	72
Abbildung 23.	AAA verringert das Sphäroidwachstum mit steigender Konzentration.	73
Abbildung 24.	AAA zerstört die parallele Anordnung der Photorezeptoren im Explantat bis div8.	74
Abbildung 25.	Müllerzellen schwellen unter 1 mM AAA an und erzeugen einen ‚Riss‘ in der INL im Explantatsystem zwischen Kulturtag 6 und 10.	76
Abbildung 26.	AAA verhindert die OLM-Bildung im Explantat. Explantate wurden mit 1 mM AAA behandelt.	77
Abbildung 27.	AAA steigert die Apoptosen im ‚INL-Riss‘ und bildet einen PAX6 ⁺ -Zellstreifen.	79
Abbildung 28.	AAA wirkt toxischer zu späten als zu früheren Stadien der <i>in vitro</i> Entwicklung.	81
Abbildung 29.	Der durch AAA erzeugte ‚INL-Riss‘ ist nicht identisch mit der Chievitz-Schicht (LOC).	82
Abbildung 30.	AAA erzeugt oxidativen Stress im 3D-Kultursystem.	83
Abbildung 31.	AAA steigert die Katalase-Expression (RT-PCR) mit steigender AAA-Konzentration im Rosettensphäroid am Tag 6 und 10.	84
Abbildung 32.	Ascorbat erzeugt in erhöhter Dosis oxidativen Stress im Rosettensphäroid.	85
Abbildung 33.	AAA induziert eine GFAP Expression.	87
Abbildung 34.	AAA zeigt keinen toxischen Einfluss auf reine Müllerzell-Monolayer, welche mit verschiedenen AAA-Konzentrationen (1 und 4 mM AAA) für 24 Stunden behandelt wurden.	88
Abbildung 35.	AAA-Dosisabhängigkeit der GDNF- und GFR α 1-4-Expressionen.	90
Abbildung 36.	AAA-Dosisabhängigkeit der BDNF-, PEDF- und TrkB-Expressionen.	91
Abbildung 37.	GDNF beschleunigt die Entwicklung von Stäbchen <i>in vitro</i> .	93
Abbildung 38.	GDNF hat keine Auswirkung auf die IPL- und Zapfen-Entwicklung im Explantat.	94
Abbildung 39.	Keine Veränderung der GS-Immunfärbung Abbildungsverzeichnis von Wachstumsfaktoren.	96
Abbildung 40.	GS-Expressionsmuster in reinen Müllerzell-Kulturen unter Behandlung mit verschiedenen Wachstumsfaktoren.	97

Abbildung 41.	Expressionsmuster von GDNF und von GFR α 1-4 in reinen Müllerzell-Kulturen, unter Behandlung mit verschiedenen Wachstumsfaktoren.	98
Abbildung 42.	Expressionsmuster von BDNF, PEDF und TrkB in reinen Müllerzellkulturen, unter Behandlung mit verschiedenen Wachstumsfaktoren.	99
Abbildung 43.	Kein Wachstumsfaktor zeigt einen Einfluss auf die Vimentin- und Katalase-Expression.	100
Abbildung 44.	BDNF und GDNF zeigen keinen Einfluss auf die gliotoxischen Wirkungen von AAA.	101
Abbildung 45.	BDNF oder GDNF haben keinen Einfluss auf retinale Apoptosen bei AAA-Behandlung.	102
Abbildung 46.	PEDF verringert die Auswirkungen von AAA auf die INL im Explantat.	104
Abbildung 47.	PEDF reduziert den AAA-Einfluss auf die Müllerzell- und ONL-Struktur.	105
Abbildung 48.	PEDF reduziert den AAA-induzierten Zelltod der Müllerzellen.	105
Abbildung 49.	PEDF bewirkt einen <i>rescue</i> auf die IPL-Strukturen unter dem Einfluss von AAA.	107
Abbildung 50.	PEDF fördert seine eigene Expression, aber nicht unter dem Einfluss von AAA.	108
Abbildung 51.	AAA-Stimulierte GFAP-Expression wird durch PEDF reduziert.	109
Abbildung 52.	AAA <i>rescue</i> der Müllerzell-Struktur-, ONL- und OPL-Strukturen durch PEDF.	111
Abbildung 53.	PEDF reduziert den durch AAA in Müllerzellen verursachten oxidativen Stress.	112

Diskussion

Abbildung 54.	Gleicher Ascorbat-Effekt auf Gehirn-Monolayer und Sphäroiden.	118
Abbildung 55.	Schematische Darstellung des Anschwellens von Müllerzellen unter Aminoadipat (AAA).	130
Abbildung 56.	Elektronenmikroskopische Untersuchungen der äußeren Segmente der Photorezeptoren.	132
Abbildung 57.	Forskolin stimuliert die TrkB-Expression.	134

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Eingesetzte Konzentrationen der verwendeten Wachstumsfaktoren.	35
Tabelle 2	Eingesetzte Erstantikörper mit verwendeten Verdünnungen und Inkubationszeiten.	44
Tabelle 3	Eingesetzte Zweitantikörper mit verwendeten Verdünnungen und Inkubationszeiten.	45
Tabelle 4	Zusammensetzung der Färbelösung nach Karnovsky & Roots	48
Tabelle 5	Pipettierschema für cDNA-Synthese (RT-PCR)	53
Tabelle 6	PCR-Pipettierschema pro Ansatz	54
Tabelle 7	Katalase-Test Pipettierschema für <i>blank</i> und Probe.	57

1 Einleitung

1.1 Die Retina des Huhns als Modellsystem

Das Gehirn ist die Steuerzentrale des gesamten Organismus. Seine Neuronen durchziehen den gesamten Körper und leiten Signale entlang von Zellfortsätzen (Axone) vom und zum Gehirn weiter. Das Gewebe des Gehirns ist äußerst komplex und seine Funktionsweise ist daher nicht trivial. Viele Krankheiten lassen sich auf eine Funktionsstörung des Gehirns zurückführen, die im ausgewachsenen Organismus oder durch eine Störung während der Entwicklung entstanden war. Daher ist es wichtig, die Funktionsweise des zentralen Nervensystems (ZNS) zu verstehen. In dieser Arbeit wurde die Retina des embryonalen Huhns als Modellsystem gewählt. Geeignete Modellsysteme und Modellorganismen sind für diese Fragestellungen unersetzlich. Die Retina entwickelt sich aus dem Neuroepithel und ist somit ein Teil des Gehirns. Die Entwicklungsprozesse der Retina sind mit dem des Gehirns vergleichbar. Darüber hinaus bietet der Hühnerembryo als Modellorganismus viele Vorteile in Bezug auf das Modellsystem Retina. Während der embryonalen Entwicklung entstehen 30 Stunden nach Befruchtung die ersten Augenanlagen. Dabei sind die Augen des Hühnerembryos, im Verhältnis zum gesamten Kopf, sehr groß. Ein besonderer Vorteil ist die leichte Zugänglichkeit des Embryos während der frühen Entwicklungsphasen. Diese Eigenschaften der extrakorporalen embryonalen Entwicklung und der exponierten Augen erleichtern die Isolation von embryonaler Retina oder deren Manipulation erheblich (1).

1.2 Entwicklung des Auges und der Hühnerretina

Die Entwicklung des Auges beginnt 30 Stunden nach der Befruchtung als seitlicher Auswuchs des Diencephalons. Durch die Interaktion zwischen Neuroepithel und Ektoderm wird die Augenbildung induziert. Das Neuroepithel invaginiert und es bildet sich ein zweischichtiges Neuroepithel (1). Die äußere Lage bildet das spätere retinale Pigmentepithel (RPE), wobei die innere Lage die zukünftige Retina bildet. Dieses doppelschichtige Neuroepithel ist eines der wenigen Gewebe, bei dem zwei apikale Seiten direkt in Kontakt stehen. Das

innere Neuroepithel besteht aus multipotenten Vorläufern, aus denen sich die sieben verschiedenen retinalen Zelltypen der Retina differenzieren. Die verschiedenen Zelltypen der Retina entstehen zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten aus multipotenten Vorläuferzellen. Die ersten Zellen, die den Zellzyklus verlassen, sind die Ganglienzellen. Es folgen die Photorezeptoren sowie die Horizontal- und die Amakrinzellen. Die letzten Zellen, die den Zellzyklus verlassen, sind die Bipolar- und die Müllerzellen (2). Die letzte Teilungsaktivität findet an Embryonaltag 12 statt (1, 3). Nach Verlassen des Zellzyklus folgt die Spezifikation bzw. Differenzierung zu funktionsfähigen Retinazellen. Nicht bei allen Zellen bedeutet der Austritt aus dem Zellzyklus die Determinierung der Vorläuferzellen. Viele Zellen entwickeln sich erst nach einer Periode der Migration an ihrer endgültigen Position zu einem bestimmten Zelltyp (4-5). Interessant ist, dass ein Differenzierungsprozess grundsätzlich im zentralen, der Linse gegenüberliegenden, Teil der Retina beginnt und sich lateral in der Retina ausbreitet.

Während der Determinierung der sieben retinalen Zelltypen entwickeln sich drei zellkernhaltige Schichten (nukleäre Schichten), die durch zwei zellkernfreie Schichten (plexiforme Schichten) getrennt werden. Die IPL (*inner plexiform layer*) bildet sich am achten Tag nach der Befruchtung. Sie entsteht durch die laterale Dendritenbildung der Ganglienzellen und durch das Auswachsen von Amakrinzell-Fortsätzen. Nach der Initiierung der IPL entwickelt sich die OPL (*outer plexiform layer*). Hierbei verschalten sich die Synapsen der Photorezeptoren mit den Bipolarzellen und den Horizontalzellen. Die OPL trennt die Photorezeptorenschicht (ONL, *outer nuclear layer*) von der INL (*inner nuclear layer*). Eine Reduzierung der retinalen Zellmasse durch Apoptose bildet die letzte Entwicklungsphase der Retina. Dabei erreicht die Retina ihre endgültige Anzahl der unterschiedlichen Zelltypen.

In Abbildung 1 ist die generelle Struktur der Retina eines erwachsenen Huhns dargestellt. Diese wird im Folgenden kurz von apikal (Photorezeptoren) nach basal (Ganglienzellen) erläutert. Die Retina wird durch das RPE nach außen von der Aderhaut abgeschirmt. In diesem Epithel ragen die äußeren Segmente (OS, *outer segments*) der Photorezeptoren hinein. Das RPE sorgt für die Nährstoffversorgung und Erhaltung der Lamellenstruktur der OS. Die dunkle Färbung des RPEs wird

durch Einlagerung von Melanin erzeugt. Die Retina wird durch die äußere limitierende Membran (OLM, *outer limiting membrane*) vom RPE abgegrenzt. Durch diese Schicht ragen nur die inneren und äußeren Segmente (IS, *inner segments*; OS, *outer segments*) der Photorezeptoren. Die erste nukleare Schicht der Retina ist die äußere nukleäre Schicht (ONL). Diese besteht aus den Zellkörpern der Photorezeptoren und den Zellfortsätzen der Müllerzellen.

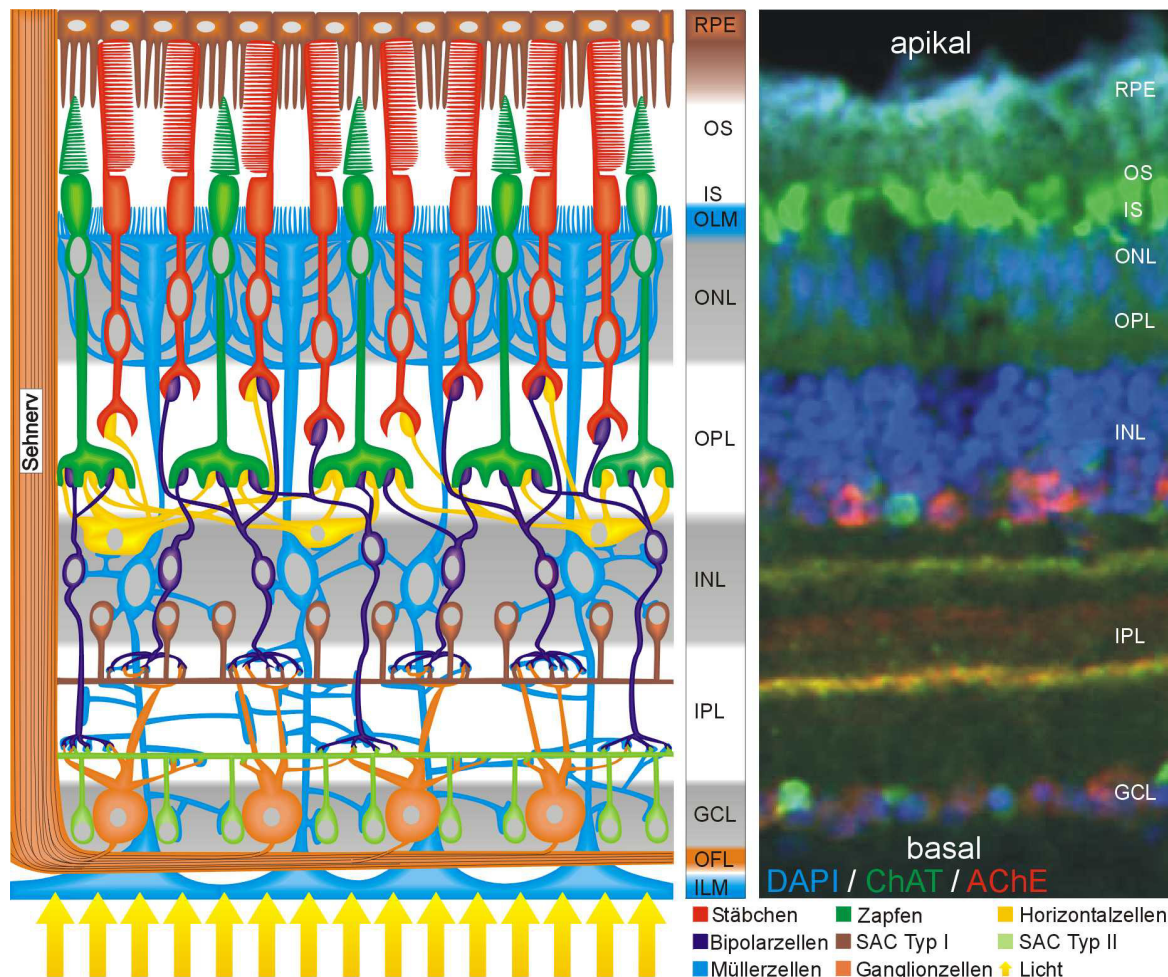


Abbildung 1. Struktur der Retina im Querschnitt. Schematische Darstellung der erwachsenen Retina (A). Kryoschnitt einer erwachsenen Hühnerretina, immunhistochemisch gefärbt gegen SACs (ChAT; grün und 3D10: rot) mit DAPI (blau als Zellkernfärbung (B)). Abkürzungen: GCL = Ganglienzellschicht, ILM = innere limitierende Membran, INL = innere nukleäre Schicht, IPL = innere plexiforme Schicht, OFL = optische Faser-Schicht, OLM = äußere limitierende Membran, ONL = äußere nukleäre Schicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, OS = Äußere Segmente, RPE = retinale Pigmentepithel, SACs = starburst amacrine cells.

Die Photorezeptoren nehmen die Lichtreize auf und geben ein Signal in der OPL an Bipolarzellen und Horizontalzellen weiter. Diese Verschaltung zwischen Photorezeptoren und Zellen der INL (Bipolarzellen und Horizontalzellen) bildet die zellkernfreie Schicht der OPL. Die Zellkörper der Bipolarzellen und

Horizontalzellen bilden einen Teil der INL. Der andere Teil wird durch Zellkörper der Müllerzellen und Amakrinzellen gebildet. Innerhalb der INL sind die Zelltypen ebenfalls in Schichten angeordnet. Diese Schichten sind allerdings nicht so stark abgegrenzt wie bei einem Übergang von der nuklearen zur plexiformen Schicht. Auf der äußersten Schicht (den Photorezeptoren zugewandten Seite) befinden sich die Horizontalzellen, gefolgt von den Bipolarzellen. Sie bilden die apikale Hälfte der INL. Auf der basalen inneren Hälfte der INL befinden sich die Amakrinzellen (mit Ausnahme der Amakrinzellen des Typs II, welche in der GCL sitzen). Getrennt werden diese beiden INL-Hälften durch die Zellkörper der Müllerzellen, die inmitten der INL sitzen. Das Lichtsignal wird durch die Amakrinzellen modifiziert und an die Ganglienzellen weitergeleitet. Diese komplexe Verschaltung befindet sich in der zweiten plexiformen Schicht der IPL. Durch die horizontale Verschaltung der Amakrinzellen und Ganglienzellen kommt es zur Ausbildung von Subbanden in der IPL. Der Zellkörper der Ganglienzellen befindet sich in der Ganglienzellschicht (GCL, *ganglion cell layer*). Sie sind die letzten Zellen der Retina, die das Lichtsignal ins Gehirn über den optischen Nerv weiterleiten. Neben den Ganglienzellen befinden sich auch noch eine Sorte Amakrinzellen (Typ II) in der GCL. Diese Zellen werden als *displaced* Amakrinzellen (Typ II; starburst amacrine cells SAC II) bezeichnet. Die Amakrinzellen des Typs I in der INL und des Typs II in der GCL treten paarweise angeordnet in der Retina auf. Beide Zelltypen projizieren ihre Zellfortsätze in die IPL. Die Ganglienzellfortsätze in Richtung Gehirn bilden auf der basalen Seite der Retina eine optische Faserschicht, (OFL, *optic fibre layer*), die zum Sehnerv hin an Dicke zunimmt. Nach innen hin wird die Retina durch die innere limitierende Membran (ILM, *inner limiting membrane*) begrenzt, die durch Zellfortsätze der Müllerzellen gebildet wird.

1.3 Die Eingangs- und Ausgangsneuronen der Retina

Die beiden größten Neuronentypen in der Retina, die Photorezeptoren und die Ganglienzellen, sollen im Folgenden noch etwas näher dargestellt werden.

1.3.1 Photorezeptoren

Die lichtsensiblen Zellen der Retina sind die Photorezeptoren. Sie sind als einziger Zelltyp in der Lage einen Lichtreiz in ein bioelektrisches Signal umzuwandeln. Dabei sind die Photorezeptoren empfindlich genug, um einzelne Photonen zu detektieren. Die Photorezeptorzellen lassen sich in drei morphologische Bereiche einteilen. Der Zellkörper der Photorezeptoren befindet sich in der ONL. Er ist eingeschlossen von Müllerzell-Fortsätzen. Müllerzellen bilden die OLM – eine abschließende Schicht, durch die nur das IS und OS der Photorezeptoren reicht. Das IS ist gekennzeichnet durch eine hohe Anzahl an Mitochondrien und den Öltropfen der Zapfen- Photorezeptoren. Das OS weist eine ausladende Anzahl an parallel geschichteten Membranen auf, in denen das Lichtsignal durch Rhodopsin und Opsin detektiert wird. Die Photorezeptoren sind in der gesamten Retina zu finden. Einzige Ausnahme ist der blinde Fleck bei Austritt des Sehnervs. Die Dichte der Photorezeptoren nimmt in Richtung der zentralen Retina zu. Die Photorezeptoren lassen sich in zwei Photorezeptortypen unterscheiden: 1. Photorezeptoren, die für das Hell-Dunkelsehen verantwortlich sind (Stäbchen) und 2. Photorezeptoren, die für das Farbsehen (Zapfen) zuständig sind.

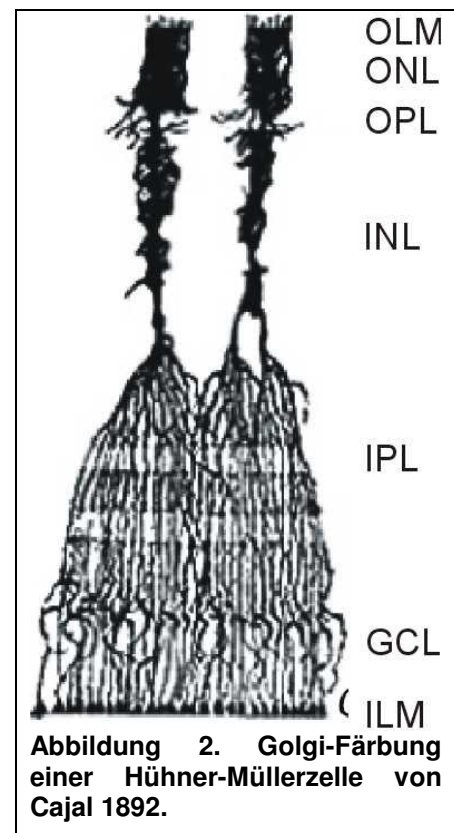
1.3.2 Ganglienzellen

Auf dem Weg der Lichtreizverarbeitung sind die Ganglienzellen die letzten retinalen Zellen, die den Lichtreiz in das Gehirn weiterleiten. Ganglienzellen sind eine der ersten postmitotischen Zellen in der retinalen Entwicklung. Die Zellkörper der Ganglienzellen befinden sich in der GCL und verschalten sich in der IPL mit Amakrinzellen und Bipolarzellen (6). Rund 80% aller Zellen in der GCL sind *displaced* Amakrinzellen, die restlichen 20% sind Ganglienzellen. Dabei ist dieses Verhältnis speziesabhängig (7). Ungefähr 1,6 Millionen Ganglienzellen in der menschlichen Retina übermitteln die Informationen von 125 Millionen Photorezeptoren (8). Hierbei werden die Photorezeptoren und INL-Neuronen von einer Müllerzelle zu einer Einheit zusammengefasst und das Signal auf die Ganglienzellen übertragen. Das Auswachsen der Ganglienzell-Axone wird gesteuert durch eine Vielzahl von Faktoren, die das Axon ins Gehirn leiten. Die Ganglienzell-Axone strecken sich zur optischen Papilla und bilden auf der innen

Seite der Retina die optische Faserschicht (OFL, *optic fibre layer*). Die Region der optischen Papilla enthält keine Photorezeptoren und wird als blinder Fleck bezeichnet. Die Ganglienzell-Axone bilden ein dichtes Bündel an Axonen, das als optischer Nerv bezeichnet wird (9).

1.4 Müllerzellen – die Radialgliazellen als zentrale Vermittler in der normalen wie auch erkrankten Retina

Die Müller-Gliazellen (i. A. Müllerzellen) gehören zu der Familie der Radialgliazellen (Astrozyten). Die Müllerzellen sind die einzigen Gliazellen, die während der Entwicklung in der Retina gebildet werden. Andere Gliazellen migrieren über den optischen Nerv und die Blutgefäße in die Retina ein (10). Bei Vögeln und einigen Säugern sind die Müllerzellen die einzigen nicht neuronalen Zelltypen (11). Der Zellkörper befindet sich mitten in der INL, mit auffallend großem Zellkern. Die Müllerzellen durchziehen, von der INL aus, die gesamte Retina (Abbildung 2). Die ILM und OLM werden durch die Endfüße der Müllerzellen gebildet. Durch diese Schicht reichen nur die inneren und äußeren Segmente (IS und OS) der Photorezeptoren. Die apikale Seite der



Müllerzellen ist geprägt von Mikrotubuli-Strukturen. Die Müllerzellen besitzen zahlreiche laterale Zellfortsätze, mit denen sie mit jedem retinalen Neuron in Kontakt stehen. Dabei unterteilen die Müllerzellen die Retina in Zellkolumnen. Hierbei wird eine gewisse Anzahl Photorezeptoren, Bipolar-, Horizontal- und Amakrinzellen (Anzahl ist Spezies abhängig) durch eine Müllerzelle zusammengefasst, die das Signal aus den Photorezeptoren verarbeiten und auf eine Ganglienzelle übertragen (7). Die Betrachtung des Müllerzell-Netzwerkes verdeutlicht ihre Funktion als Stützzelle in der Retina (12). Studien mit einem spezifischen Müller-Zelltoxin (Aminoadipat; AAA) zeigen, dass eine

Beeinträchtigung der Müllerzellen zum Verlust der retinalen Schichtungen führt (13-15). Auch die Orientierung der verschiedenen neuronalen Fortsätze wird durch die Müllerzellen stabilisiert (16-17). Studien mit geringen AAA-Konzentrationen (0,4 mM AAA) zeigen, dass die Struktur der Müllerzellen grob erhalten bleibt, aber die komplexe laterale Verschaltung der Amakrinzellen (IPL-Subbanden) aufgehoben wird (18). Die feinen lateralen Müllerzell-Fortsätze in der IPL degenerieren unter geringen AAA-Konzentrationen, so dass eine laterale Vernetzung der Amakrinzellen nicht mehr durch die Müllerzellen aufrechterhalten bleiben kann.

Während der Entwicklung der neuronalen Zelltypen durchlaufen die Neuronen eine Phase der Migration. Müllerzell-Vorläufer dienen den Neuronen als Leitschiene, bis die Neuronen ihre endgültige Reife und Position in der Retina eingenommen haben (14-15). Es wird diskutiert, wann die Müllerzellen entstehen. Bisher ist die Müllerzelle als eine der letzten retinalen Zellen entstanden (19-21). Die Müllerzell-Vorläufer besitzen allerdings dieselbe ausgestreckte Morphologie in der frühen Retina (Neuroepithel), die wichtig ist für die Entwicklung und Reifung aller retinalen Vorläufer.

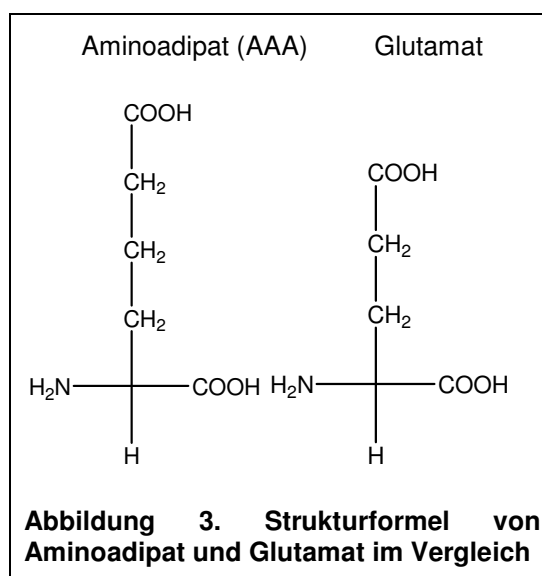
In nahezu allen Retina-degenerativen Krankheiten (z.B. Macula-Degeneration, Ischämie und Retinitis Pigmentosa) zeigen die Müllerzellen eine Gliose (22). Selbst bei der diabetischen Retinopathie und Retinaablösungen zeigen sich gliotische Müllerzellen. Die gliotischen Müllerzellen zeigen eine deutlich veränderte Genexpression (besonders im Gen *glial fibrillary acidic protein* GFAP), Veränderung in ihrer Morphologie und Physiologie (12, 23). Die Müllerzellen dienen den Neuronen als Ressource für eine Vielzahl von trophischen Faktoren (GDNF, BDNF, PEDF, etc.) und beseitigen metabolische Stoffe (24). Gliotische Müllerzellen zeigen ein gestörtes Expressionsverhalten vieler neuroprotektiver Faktoren. Zudem schwillt der Zellkörper der Müllerzellen an und erzeugt Ödeme in der Retina, was am Ende zum Absterben der Neuronen führt (12). Dabei gibt es eindeutige Hinweise, dass der Verlauf der Müllerzell-Gliose über den Krankheitsverlauf in der Retina bestimmt (22). Eine weitere besondere Fähigkeit der Müllerzellen zeigte sich in den letzten Jahren. Die Müllerzellen sind in der Lage, wieder in den Zellzyklus einzugehen (25-26). Dabei sind die Müllerzellen zur

spontanen Transdifferenzierung in der Lage und besitzen somit multipotente Eigenschaften (27-28).

Gerade aus den Eigenschaften im letzten Abschnitt wird deutlich, dass die Müllerzellen eine Schlüsselrolle bei der Therapie sämtlicher retinalen Krankheiten spielen könnten. Darüber hinaus sind die multipotenten Eigenschaften der Müllerzelle besonders für die Regenerierung des retinalen Gewebes interessant.

1.4.1 DL- α -Aminoadipat wirkt toxisch auf Radialgliazellen (MCs)

DL- α -Aminoadipat (AAA) ist ein gliazellspezifisches Toxin (29-31), welches ein Analog zu Glutamat ist, das sich nur durch eine Methylgruppe unterscheidet (Abbildung 3). L-AAA kommt in der Natur als Zwischenprodukt im L-Lysinstoffwechsel vor. Für höhere Lebewesen ist L-Lysin eine essentielle Aminosäure, die mit der Nahrung aufgenommen werden muss. Die L-Lysinsynthese ist unter den 20 Aminosäuren die einzige mit zwei Synthesewegen (L-AAA-Weg und Diaminopimelat-Weg). Der L-AAA-Syntheseweg ist nur in Euglenia und



höheren Pilzen zu finden (32). Das in dieser Arbeit verwendete Müllerzell-Toxin ist zusammengesetzt aus zwei isomeren Strukturen, der L- und D-Form. In vielen Publikationen wird die Wirkung der Einzelkomponenten D- und L-AAA beschrieben und verglichen. Hierbei wirkt L-AAA weitaus toxischer als D- und DL-AAA. Außerdem ist L-AAA nicht gliaspezifisch, da es eine negative Wirkung auch auf Neuronen hat (33-35). Die andere isomere Form (D-AAA) ist nicht neurotoxisch (33, 35-36) und nur schwach gliatoxisch (37-38). Interessanterweise wirkt D-AAA in Kombination von D- und L-AAA als Antagonist für die neurotoxische Wirkung von L-AAA und die Gliatoxizität bleibt erhalten (33, 36, 39).

Die Wirkungsweise von AAA und seiner Komponenten L- und D-Aminoadipat wurde in verschiedenen Arbeitsgruppen erforscht. Die Zusammenfassung nach Kato wird im Folgenden beschrieben (40). Die schematische Abbildung 4 der Wirkungsweise von AAA zeigt auf der linken Seite den normalen Verlauf und auf der rechten Seite den von AAA beeinflussten Verlauf. Im Normalfall wird das von den Müllerzellen aufgenommene Cystin unter anderem für die Synthese von Glutathion (GSH) verwendet, welches ein starkes Antioxidanz ist. Müllerzellen sind mit einem Na^+ -abhängigen Glutamattransporter ausgerüstet. Dieser Transporter ist nicht spezifisch für Glutamat, sondern ist auch in der Lage andere Aminosäuren zu transportieren. (41-45). Wegen der Strukturanalogie von AAA zu Glutamat bietet sich der Transport von AAA über den Na^+ -abhängigen Glutamattransporter an. Studien von Huck *et al.* (1984) (46) beweisen, dass Gliazellen AAA über diesen Transporter aufnehmen (46). Bei genaueren Studien erzeugt L-AAA eine Verminderung oder Blockierung des Glutamateinstroms in Müllerzellen (47).

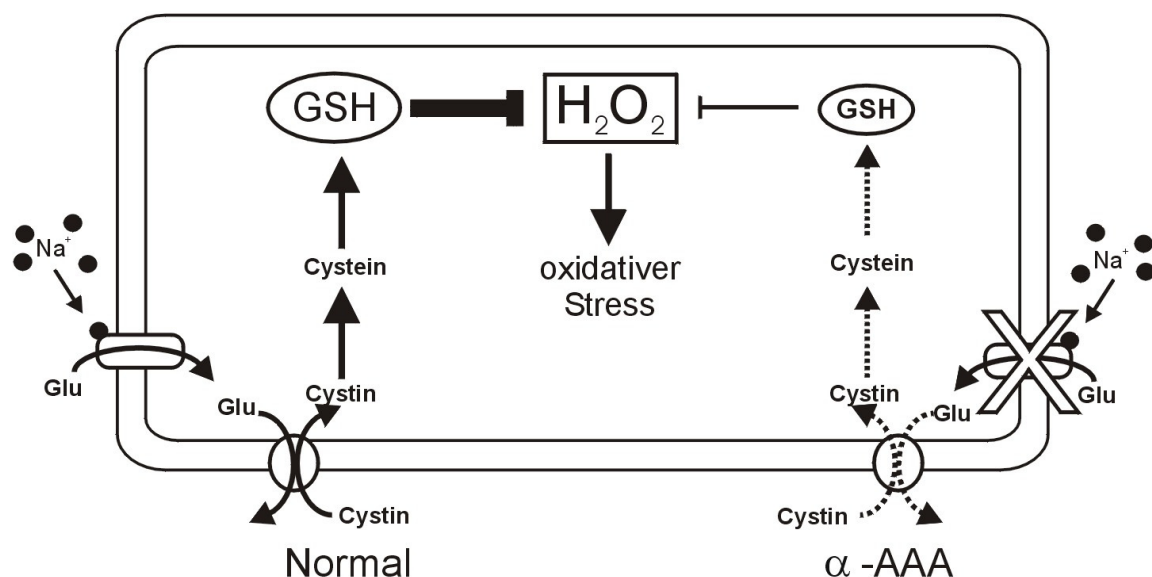


Abbildung 4. Schematische Darstellung der Entstehung von oxidativem Stress durch DL- α -Aminoadipat (AAA) in Müller-Gliazellen. Im normalen Zustand (linke Bildhälfte) wird Glutamat über den Natrium-abhängigen Glutamattransporter in die Zelle transportiert. Das intrazelluläre Glutamat wird unter anderem für die Einfuhr von Cystin über den Glutamat/Cystin-Antiporter verwendet. Cystein ist ein Baustein des Antioxidans GSH. AAA ist ein Analog zu Glutamat und blockiert den Glutamattransporter. Die niedrige intrazelluläre Glutamat-Konzentration führt zu geringer Cystin-Aufnahme und zu Störung des GSH-Systems. Das angereicherte H_2O_2 in der Zelle greift verschiedene Komponenten der Zellen an. GS: Glutaminsynthetase, GSH: Glutathion, Glu: Glutamat. (Schema nach Kato (40) modifiziert).

Interessant ist, dass L-AAA eine doppelt so hohe Affinität zum Na^+ -abhängigen Glutamattransporter besitzt als Glutamat (39). Dies führt zu einer niedrigen

Konzentration an intrazellulärem Glutamat. Der Mangel an Glutamat führt zum geminderten Einstrom von Cystin (47-49). Bei dem Cystintransporter handelt es sich um einen Antiporter, der in Abhängigkeit von intrazellulärem Glutamat Cystin importiert. Cystin wird in der Zelle zu Cystein umgewandelt, welches ein wichtiger Baustein für Glutathion ist. Die Reduktion von intrazellulärem Cystein führt zu Erniedrigung der Glutathionsynthese. So verringert sich der Schutz gegen H_2O_2 , welches sich in der Zelle anreichert und zum Zelltod durch oxidativen Stress führt (48). Zwischen der intrazellulären GSH-Konzentration und der extrazellulären Cystin-Konzentration besteht eine direkte Abhängigkeit (50). Glutathion scheint ein wichtiger Schutzmechanismus in Gliazellen zu sein, da die GSH-Konzentration in Gliazellen höher ist als in anderen Zelltypen und die Cystinaufnahme nur auf Gliazellen beschränkt ist. (51-52).

Die spezifischen Auswirkungen von AAA auf Müllerzellen in retinalem Gewebe sind für diese Arbeit von besonderem Interesse. Durch AAA schwellen die Müllerzellen gliotisch in retinalem Gewebe an und erzeugen eine Gliose. Die Gliose tritt bei nahezu allen degenerativen Krankheiten der Retina auf und scheint eine Schlüsselrolle beim Krankheitsverlauf der Retina-Degeneration zu spielen (12). Eine Therapie der Degeneration des retinales Gewebes wird auch eine gezielte Therapierung der Gliose beinhalten. Neben dem Anschwellen des Zellkörpers dient die Expression von *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP) als Nachweis für die Gliose. GFAP ist der Hauptbestandteil des Glia-intermediären Filamentes, welches unter den Gliazellen hauptsächlich von Astrozyten gebildet wird. Interessanterweise wird GFAP von Müllerschen Gliazellen nicht oder nur sehr schwach exprimiert (53-55). Unter Stressbedingungen, wie der Gliose, steigt die Expression von GFAP in Müllerzellen und kann als Indikator für gliotische Bedingungen dienen (12, 56-58). Für die Fragestellung dieser Arbeit bietet sich die Hühnchenretina in besonderer Weise an, da die Hühnchenretina nur eine Sorte Gliazellen, die Müllerschen Gliazellen, besitzt. Wenn eine Gliose durch AAA ausgelöst wird, ist ein Anstieg der GFAP-Expression zu verzeichnen.

Im Folgenden werden die wichtigsten AAA-Effekte zusammengefasst, die für diese Arbeit wichtig sind. DL-AAA lässt die Müllerzellen anschwellen, der Grund hierfür ist unbekannt (59-60). Dieser Effekt wurde unter AAA-Behandlung in vielen Organismen beobachtet (30-31, 61-62). Den größten AAA-Effekt weisen die OLM

und ONL auf. Unter AAA löst sich die parallele Orientierung der Photorezeptoren auf und die OLM verschwindet (63-65). Die Zahl der Photorezeptoren wird dabei nicht beeinflusst (63-65). Die Strukturen der Retina werden von den Müllerzellen entwickelt und aufrecht erhalten (15). Unter AAA-Einfluss leidet die gesamte Struktur der Retina. All diese Effekte von AAA auf retinales Gewebe dienen in dieser Arbeit als Kontrolle für die Wirkung von AAA auf Sphäroide und auf ein neu entwickeltes Explantatsystem.

1.5 3D-Kultursysteme

Die meisten Experimente können aus verschiedenen Gründen nicht direkt im Organismus durchgeführt werden. Allein die Anzahl der Tiere und Menschen wäre immens. Die Zellen sind im Organismus einer Vielzahl von Signalen ausgesetzt. Um einen Effekt einer Substanz auf einen bestimmten Zell- oder Gewebetyp zu untersuchen, benötigt man ein isoliertes System, mit dem die Experimente durchgeführt werden können. Neben diesem Vorteil der Kultur ist zu bedenken, dass die Zellen nicht mehr in ihrer natürlichen Umgebung wachsen und somit auf andere Substanzen reagieren können. Daher ist es wichtig, geeignete Kultursysteme und Medien zu verwenden, die im kleinen Maßstab zu Erkenntnissen führen. Mit dem geeigneten Kultursystem können verschiedene Zelltypen oder eine gemischte Population bei ihrer Entwicklung beobachtet und durch Zugabe oder Entzug von Substanzen manipuliert werden. Es ist allerdings auch von großer Bedeutung so nah wie möglich am realen Organismus mit seinem Kultursystem zu sein.

Die einfachste Kulturform ist die Monolayer-Kultur, in der die Zellen in 2D auf dem Kulturgefäßboden festwachsen. Hier können die Einflüsse von Zusätzen, z.B. auf die Morphologie der Zellen, untersucht werden. Immer mehr Forschungsgruppen interessieren sich für 3D-Kultursysteme, da es sich gezeigt hat, dass ein 3D-Kultursystem wesentlich besser die *in vivo*-Reaktion widerspiegelt als ein 2D-System. Einfachste Erklärung hierfür ist die Kommunikation zwischen den Zellen. In 2D-Kulturen ist die Kontaktfläche einer Zelle nur lateral, also wesentlich geringer, als in einem 3D-Kultursystem. Außerdem können die Effekte eines Zusatzes im Gewebeverband untersucht werden. Es hat sich gezeigt, dass ein Monolayer ein anderes Expressionsmuster zeigt als in einem 3D-System (66). Das

Verhältnis der Zelltypen in einer Mischkultur kann sich zwischen 2D und 3D ebenfalls unterscheiden, gezeigt für Stäbchen- und Zapfen-Photorezeptoren (67). Das Verhältnis der Photorezeptoren im 3D-System ähnelt im Wesentlichen der *in vivo*-Situation.

Explantate und Sphäroide stehen als 3D-System zu Verfügung. Bei dem Sphäroid-System fügen sich dissoziierte embryonale Retinazellen zu runden Aggregaten zusammen, welche als Rosettensphäroide bezeichnet werden. Hierbei steht die Kultur unter ständiger horizontaler Rotation. Die einzelnen Zellen organisieren sich über Zell-Zell-Erkennungs- und *sorting out*-Prozesse. Nach der Steinberg-Hypothese lagern sich die Zellen mit der höchsten Adhäsion zuerst im Zentrum des Aggregates zusammen (68). Bei diesen Zellen handelt es sich um Photorezeptor-Vorläufer, die sich zu einer Hohlkugel zusammen lagern (69). An der Hohlkugel lagern sich Zellen mit schwächerer Adhäsivität an. Nach der Zusammenlagerung reorganisieren sich die Zellen und bilden dabei *in vivo* ähnliche Strukturen aus. Dieser Prozess läuft innerhalb der ersten 24 Stunden *in vitro* ab. Durch Proliferation und Differenzierung wachsen die Sphäroide in den folgenden Tagen heran.

Im Gegensatz zu 2D-Kultursystemen zeigen die Sphäroide trotz der Dissoziation des retinalen Gewebes histotypische Strukturen, die den *in vivo*-Strukturen ähneln (70). Der Sphäroid ist geprägt von organisierten und diffusen Bereichen. Abbildung 5 zeigt Kryoschnitte von E17 *in vivo*-Retina, Tag 17 *in vitro*-Explantate und Tag 8 *in vitro*-Sphäroide in verschiedenen immunhistochemischen Färbungen. Die Sphäroide besitzen Hohlräume, die von Photorezeptoren gebildet werden (Rosetten). Diese Rosetten sind meist von einer OPL und einer INL umringt (Stern in Abbildung 5). Außerdem weisen die Sphäroide IPL ähnliche zellkernarme Bereiche auf, die von einer Vielzahl von Zellfortsätzen ausgefüllt sind (Dreieck in Abbildung 5). Der Sphäroid besteht allerdings nicht ausschließlich aus geordneten Strukturen. Zwischen den genannten Strukturen (Rosette und IPL) befinden sich unorganisierte Bereiche. Alle retinalen Zelltypen kommen in diesen ungeordneten Bereichen vor. Hierbei ist zu erwähnen, dass die Sphäroide nicht nur in ihrer Größe und Anzahl variieren, sondern auch in der Anzahl an IPL und Rosettenbereichen. Das Auftreten von mehreren histotypischen Strukturen

innerhalb eines Sphäroides entsteht durch eine frühe Adhäsion der kleinen Aggregate (67).

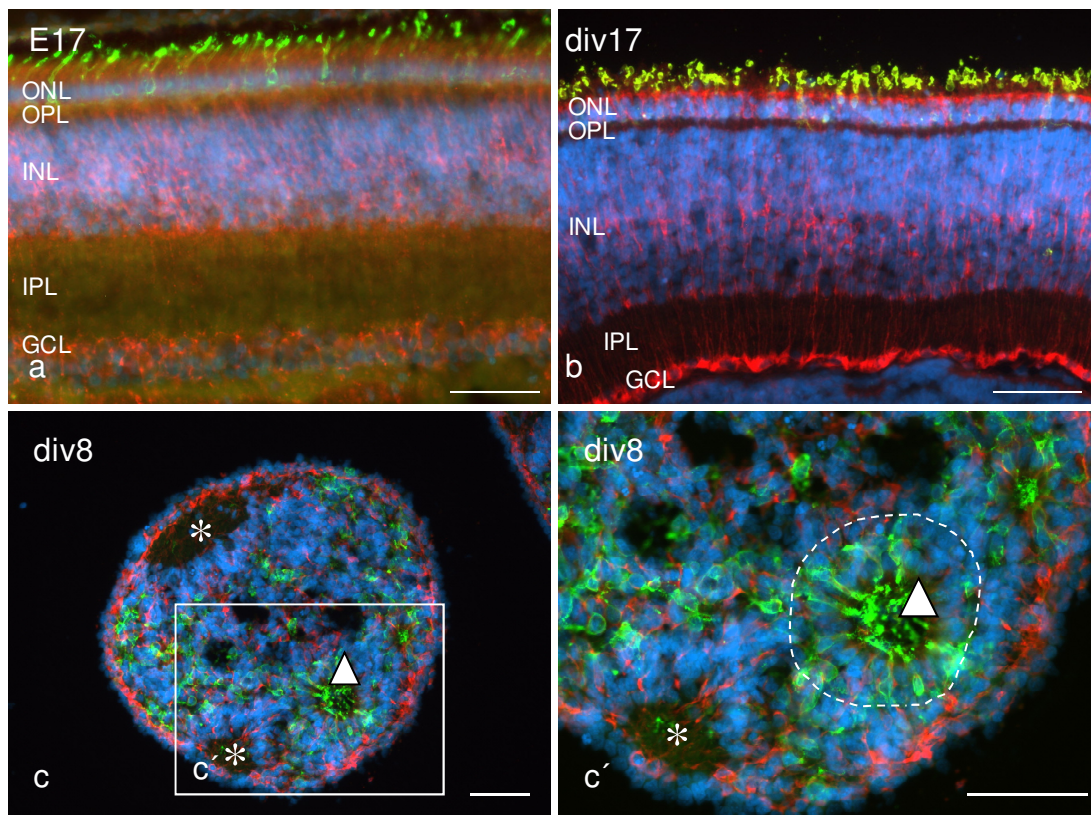


Abbildung 5. Immunhistochemisch gefärbte Kryoschnitte einer E17 *in vivo*-Retina (a), eines div17 Explantats (b) und eines div8 Sphäroids (c, c'). Die Kryoschnitte wurden alle gegen Glutaminsynthetase und Stäbchen-Photorezeptoren gefärbt. Die Struktur des Explantats gleicht der *in vivo*-Retina. Der Sphäroid weist die Merkmale der IPL (Stern) und ONL (Dreieck; Rosetten) auf. In der vergrößerten Ansicht c' von Bild c ist zu erkennen, dass die Photorezeptoren in gleicher Weise in der Rosette angeordnet sind wie *in vivo* und im Explantat. Maßstab: 50 µm.

Eine höhere retinale Organisation *in vitro* zeigt nur ein Explantatsystem. Hierbei werden ganze Retinastücke in Kultur überführt. Im Gegensatz zum Sphäroid-System wird auf eine Untersuchung der Reaggregation-Fähigkeit in An/Abwesenheit von Zusätzen verzichtet. Bei dem Explantatsystem steht die Entwicklung der einzelnen Zelltypen und der Schichtenbildung (OPL und IPL) im Vordergrund. Dabei ist es von besonderem Vorteil, wenn die Explantate ohne spezielle Zusätze und ohne Matrix, wie etwa einer Zellulosemembran, auskommen. Das ideale System besitzt dieselben Kulturbedingungen wie die Sphäroid-Kultivierung. Darüber hinaus sollten die Explantate stabil genug sein, um eine Kultivierung von mehr als 10 Tagen *in vitro* überstehen zu können. Teil dieser Arbeit war die Entwicklung dieses Explantatsystems (71).

1.6 Neurotrophe Faktoren

Die retinale Entwicklung und Erhaltung wird gesteuert durch eine Vielzahl von Faktoren. Hierzu zählen ex- und intrinsische Signale (19, 21, 72). Von besonderem Interesse sind die extrinsischen Faktoren, zu denen auch die neurotrophen Faktoren gehören. Sie werden von einer Donorzelle sekretiert und erzeugen bei der Akzeptorzelle eine Reaktion. Die Donorzellen können in manchen Fällen auch den Rezeptor für den eigenen sekretierten Faktor besitzen und einen Einfluss auf sich selbst ausüben.

Im erwachsenen (adult) Nervensystem kommen neurotrophen Faktoren besondere Bedeutung bei der Erhaltung von bestehenden Nervenstrukturen zu. Bei Schädigung und Stress helfen diese Faktoren den Zellen die Proliferation und Differenzierung anzuregen oder wie bei verschiedenen Krankheiten das Überleben der Zellen zu beeinflussen (73). Aus diesem Grund zeigen neurotrophe Faktoren ein großes Potential bei der Behandlung von degenerativen Krankheiten des zentralen und peripheren Nervensystems (74-78). Ein Beispiel für Retinadegenerative Krankheiten ist die Retinitis Pigmentosa. Bei diesem Krankheitsmodell sterben die Photorezeptoren im Krankheitsverlauf ab. Mehrere Studien zeigen, dass Wachstumsfaktoren eine Rolle bei der Behandlung spielen. (79-81). Injektionen von *basic fibroblast growth factor 2* (FGF2 oder bFGF) in den Glaskörper eines Retinitis-Pigmentosa Mausmodell zeigen eine signifikante Reduktion des Photorezeptor-Zelltodes. In Kombination von FGF2 und CNTF reduziert sich das Absterben der Photorezeptoren bei lichtinduziertem Zelltod.

Brain derived neurotrophic factor (BDNF), *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) und *pigment epithelium derived factor* (PEDF) sind weitere wichtige Wachstumsfaktoren, die spezifische Wirkung auf die Entwicklung und Regeneration der Retina haben. GDNF und PEDF regulieren die Entwicklung der Photorezeptoren. PEDF ist entscheidend für die morphologische Entwicklung der OS der Photorezeptoren. BDNF gilt als der Überlebensfaktor für Ganglienzellen. Diese und weitere Eigenschaften werden in den folgenden Abschnitten näher beschrieben.

1.6.1 *Brain derived neurotrophic factors (BDNF)*

BDNF ist, zusammen mit NGF, NT-3, NT-4 und NT-5, ein Mitglied der NGF Familie. BDNF kann an zwei Typen von Neurotrophin-Rezeptoren binden, den Tyrosin-Kinase-Rezeptor-B (TrkB) und den Neurotrophin-Rezeptor p75 (82). Ähnlich wie für die TGF- β -Familie besitzt jedes Mitglied seinen eigenen Rezeptor. NGF bindet an TrkA (83), BDNF und NT-4/5 bindet an TrkB (84-85) und NT-3 an TrkC (86). Alle Mitglieder binden ebenfalls mit niedriger Affinität an p75 (87-88). Der TrkB-Rezeptor ist in Ganglienzellen, Amakrinzellen und Müllerzellen exprimiert (89-90). In der Ratte wurden BDNF (91) und TrkB (92) mittels mRNA-Expression in Müllerzellen nachgewiesen. Die Ligandenbindung von BDNF an TrkB induziert intrazelluläre Kaskaden: Ras/Raf-1- und Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt Signalweg. Beide Signalwege sind wichtige Schalter, die über das Überleben der neuronalen Zelle bestimmen (93-94).

Neurotrophine im Allgemeinen spielen eine große Rolle bei der Differenzierung und dem Überleben von Neuronen. Besonders Ganglienzellen sind auf neurotrophe Signale angewiesen. In verschiedenen Glaukoma-Modellen steigert BDNF das Überleben der Ganglienzellen. Glaukoma ist eine Retina-degenerative Erkrankung, bei der die Ganglienzellen im Verlauf der Krankheit absterben (95-96). Gleiches pathologisches Verhalten zeigt sich bei der Durchtrennung oder Quetschung des Sehnervs. Hierbei sterben 90% aller Ganglienzellen in der Retina innerhalb kurzer Zeit ab (97-98). BDNF ist auch hier in der Lage das Überleben der Ganglienzellen zu fördern (99-104). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine direkte Beziehung zwischen Retina-Ganglienzellen und dem Kontakt zum Gehirn besteht. Tatsächlich wurde eine axonale Versorgung der Ganglienzellen/Retina mit BDNF über den Sehnerv nachgewiesen und dass diese Versorgung entscheidend für das Überleben der Ganglienzellen ist (105-106). Hierbei wird BDNF im Tektum (Teil des Mittelhirns) gebildet und anterograd axonal zur Retina transportiert. Bei einer Blockierung des tektalen BDNF-Transportes durch BDNF-Antikörper oder durch Tetrodotoxin (TTX) steigt die Apoptose in der GCL (106-107). Beim Verlust dieser Versorgung sterben die Ganglienzellen ab. Innerhalb der Retina wurde ebenfalls die Expression von BDNF in den Ganglienzellen und in der INL nachgewiesen (90, 108-109). Diese BDNF-

Expression steigt nach Überführen in eine *in vitro*-Umgebung oder Sehnervdurchtrennung (110-111) an.

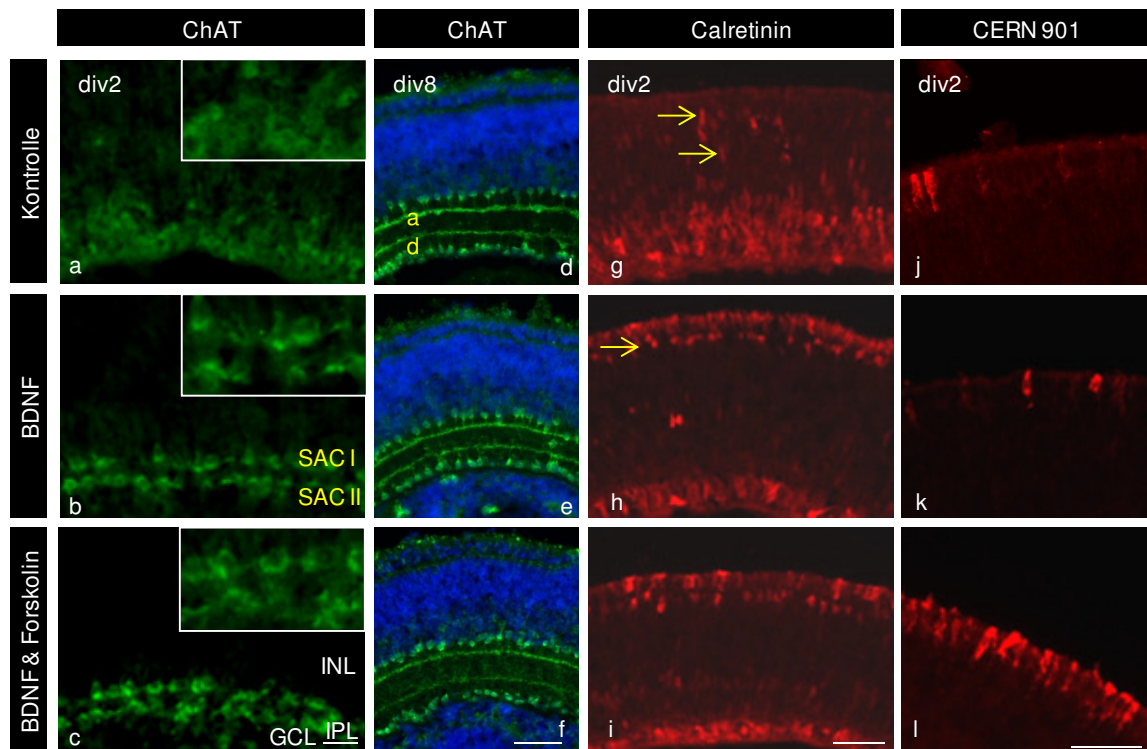


Abbildung 6. BDNF fördern die IPL- und OPL-Entwicklung, aber nur in Kombination mit Forskolin wird auch die Photorezeptor-Entwicklung gefördert. Explantate wurden mit BDNF (10 ng/ml) und/oder Forskolin (5 μ M) behandelt. Kryschnitte wurden gegen ChAT- (grün; a-f) und Calretinin- (rot; g-i) CERN 901 (rot; j-l) und DAPI (blau) immunhistochemisch gefärbt. Beachte, dass BDNF und BDNF/Forskolin zu div2 (a-c) eine IPL-Förderung zeigen, welche in weiter differenzierten Explantate (div8) verschwunden ist. Die Calretinin⁺-Zellen (zukünftige Horizontalzellen; Pfeile) sind in der Kontrolle noch in Migration, während sie in BDNF-behandelten Explantaten ihre endgültige Position erreicht haben (g und h). Beachte, dass nur in BDNF/Forskolin-behandelten Explantaten mehr Stäbchen Rhodopsin exprimieren (j-l). SACs: starburst amacrine cells type-I und type-II. Maßstab: 20 μ m a-c; 50 μ m d-l.

Diese Steigerung ist allerdings nicht ausreichend, um das Überleben der Ganglienzellen zu gewährleisten. Auch zugeführtes BDNF ist allerdings nicht in der Lage auf Dauer das Überleben der Ganglienzellen zu sichern (103, 112-113). Daher ist es wichtig, den Impuls von BDNF zu verlängern oder zu verstärken. Einen Ansatz bietet die Behandlung mit Forskolin. Forskolin ist ein Diterpen, welches erstmals aus *Plectranthus barbatus* isoliert wurde. Die Behandlung mit Forskolin bewirkt in erster Linie eine gesteigerte Expression des BDNF-Rezeptors TrkB (114). Die Expression von TrkB wird durch ein *cAMP-responsive-element* (CRE) induziert (115). Darüber hinaus wird die Adenylcyclase aktiviert, sodass die intrazelluläre cAMP-Konzentration steigt, was die Expression von TrkB begünstigt (116). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der erhöhte cAMP-

Spiegel zu einer schnelleren Rekrutierung des TrkB-Rezeptors an die Zellmembran führt (117).

Die Wirkung von BDNF auf die frühe Entwicklung von retinalem Gewebe war Bestandteil einer Diplomarbeit von Julia Wiedemann unter meiner Leitung. Die überlebenssteigernde Wirkung von BDNF auf Ganglienzellen ist bekannt. Allerdings reicht die Einzelbehandlung mit BDNF zur Therapie von Glaukoma nicht aus. In der Diplomarbeit wurde mittels 5 μ M Forskolin die Wirkung von 10 ng/ml BDNF auf Ganglienzellen verdoppelt. Wie die weiteren Studien zeigten steigert eine Forskolin-Konzentration von 5 μ M die TrkB-Expression um ca. 50%.

Neben der klassischen Wirkung von BDNF auf Ganglienzellen scheint BDNF die gesamte Entwicklung der frühen Retina zu fördern. Mit Hilfe verschiedener Marker wurde gezeigt, dass BDNF auf die Entwicklung der verschiedenen Neuronen eine fördernde Wirkung hat. BDNF fördert die Anordnung der Cholinacetyltransferase⁺ (ChAT)⁺-cholinergen *starburst amacrine cells* (SACs, Typ I und Typ II) und die gesamte Entwicklung der IPL, gezeigt in Abbildung 6. Auch die Migration der Horizontalzellen zur apikalen Seite der INL wird durch exogenes BDNF beschleunigt, gezeigt durch eine Färbung gegen Calretinin. Während für die IPL- und Horizontalzell-Migration eine einfache BDNF-Behandlung ausreicht, zeigt BDNF nur in Kombination mit Forskolin eine fördernde Wirkung auf die Stäbchen-Entwicklung. Calretinin wird in der INL in vielen Amakrinzelltypen und Horizontalzellen gebildet. (118).

BDNF zeigt ein breites Wirkungsfeld während der retinalen Entwicklung der Retina. Für diese Arbeit ist BDNF und Forskolin eine relevante Behandlungsform, um die Funktion der Radialgliazellen (Müllerzellen) innerhalb der Retina näher zu ergründen.

1.6.2 *Pigment epithelium-derived factor (PEDF)*

PEDF wurde zuerst im Kulturmedium von fötalen humanen RPE-Zellen identifiziert (119-120). Das RPE ist ein pigmentiertes Epithel auf der äußeren Seite der Retina. Es schützt die Photorezeptoren und versorgt sie mit Nährstoffen. Ohne das RPE entwickeln sich die OS der Photorezeptoren nicht in der typischen parallel geschichteten Lamellenform (121-124). Eine PEDF-Behandlung konnte in Explantat-Versuchen ohne RPE eine Verbesserung der Photorezeptor-OS-

Struktur hervorrufen (121-124). Besonders der C- und T-Terminus des PEDF-Proteins ist hoch konserviert in den verschiedenen Spezies und in der Serpin Familie (125). Das 50 kDa große PEDF-Protein wird sekretiert (125-128), extrazellulär aktiviert (125) und kann an die extrazelluläre Matrix (Collagen) binden (129-130). PEDF wird in vielen nicht neuronalen Geweben exprimiert (Skelettmuskeln, Knochen, Herz, Plazenta und Leber) (131). Im Gehirn wird PEDF in allen Regionen exprimiert (132). Speziell im Auge wird PEDF besonders im RPE gefunden, aber auch in allen Retinaschichten (133).

Der Rezeptor für PEDF ist bislang nicht identifiziert worden. Als mögliche Kandidaten kommen zwei Proteine infrage: Ein *lipase-linked membran protein* (134) und ein neues Mitglied der *patatin-like phospholipase domain-containing 2*-Familie (135). Durch PEDF werden verschiedene intrazelluläre Signalwege angesprochen. PEDF bewirkt eine Phosphorylierung vom *inhibitor of NF-κB* (IκB) und aktiviert so den anti-apoptotischen NF-κB. Dabei wird die Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl2 und Bclx induziert. Eine gesteigerte Expression von BDNF, GDNF und NGF wurde ebenfalls festgestellt (136). Desweiteren wird der MEK/ERK-Signalweg aktiviert (137-138). Auch Apoptose-Signale werden durch PEDF-Behandlung blockiert. PEDF eliminiert den *vascular endothelial cell growth factor* (VEGF) Stimulus. PEDF stimuliert Flip1, welcher einen blockierenden Einfluss auf die Aktivierung von Caspase 8 hat (138).

Dem PEDF-Protein fehlt zwar die typische Serpin-Eigenschaft, dafür besitzt es neurotrophe und anti-angiogenetische Eigenschaften. PEDF schützt Ganglienzellen und andere neurale Gewebe (cerebellar granule cells, hippocampalen Neuronen, Rückenmark und Motoneuronen) (139-145) durch Aktivierung des NF-κB- und ERK-Signalweges vor dem schädlichen Einfluss von Glutamat (139). PEDF schützt retinale Zellen auch vor oxidativem Stress durch Zugabe von H₂O₂ (131, 146-147). Auf Photorezeptoren hat PEDF nicht nur einen morphologischen Effekt (121-122), sondern auch auf das Überleben der Photorezeptoren in einem retinadegenerativen Mausmodell (148-149). Im Retinitis Pigmentosa Mausmodell zeigt eine PEDF-Behandlung ebenfalls eine Verbesserung (148-150). Dabei scheint PEDF auf Stäbchen- und Zapfen-Photorezeptoren in derselben Weise zu reagieren. Während der retinalen Entwicklung wird die Stäbchen-Photorezeptoren-Entwicklung verzögert (151).

Einige Studien weisen auf anti-tumorale Eigenschaften einer PEDF-Behandlung hin. PEDF spielt bei der Versorgung des Tumorgewebes mit Blutgefäßen eine Rolle. VEGF ist bekannt als angiogener Faktor. Es zeigte sich immer wieder, dass PEDF ein Gegenspieler zum VEGF-Impuls ist. Trotz VEGF-Behandlung wird die Gefäßbildung durch Zugabe von PEDF reduziert (152-156). Desweiteren muss ein Zusammenhang zwischen Tumorgewebe und PEDF-Expression existieren, da die PEDF-Expression in aggressiven metastasierenden Tumoren fehlt (155, 157-158). Auch bei Diabetis-Patienten fehlt die PEDF-Expression (159-161). Die Pathologie der neovaskulären Krankheiten wird mitunter auf ein gestörtes Gleichgewicht zwischen PEDF und VEGF zurückgeführt (162).

Unter meiner Leitung wurde in Rahmen einer Diplomarbeit (von Jeanette Christophel) die Wirkung von PEDF auf die Entwicklung von retinalem Gewebe studiert. PEDF ist ein anti-angiogenetischer, neurotropher und neuroprotektiver Faktor (139). Von PEDF ist bekannt, dass es gegen viele stressinduzierte Degenerationen speziell in der Retina hilft. PEDF zeigt z.B. wie GDNF eine verzögernde Wirkung auf das Absterben der Photorezeptoren bei Retinitis Pigmentosa (148). Zum Nachweis der Auswirkungen auf die retinale *in vitro*-Entwicklung wurden Explantate mit 50 ng/ml PEDF behandelt. Die entstandenen Kryoschnitte wurden gegen Stäbchen-Photorezeptoren (CERN 901), Zapfen-Photorezeptoren (CERN 906) und Müllerzellen (GS) gefärbt (Abbildung 7). Zusätzlich wurde die Expression von Rhodopsin auf mRNA-Ebene untersucht und mit Hilfe von ImageJ statistisch ausgewertet. Die Ergebnisse zeigten, dass PEDF die frühe Entwicklung von Zapfen leicht beschleunigt auf Kosten der Stäbchen-Entwicklung. Dieses Verhältnis ließ sich auch in der Expressionsstudie von Rhodopsin auf mRNA-Ebene nachweisen. Unter dem Einfluss von PEDF war die Expression von Rhodopsin deutlich geringer, als in der Kontrolle.

Die Entwicklung von IPL und Müllerzellen ist von der PEDF-Wirkung unbeeinflusst. In immunhistochemischen Färbungen gegen Müllerzellen (GS) und Amakrinzellen (ChAT), wurde keine Förderung oder Blockierung der Entwicklung dieser Zelltypen festgestellt.

Auch wenn die PEDF-Wirkung scheinbar nur auf Photorezeptoren beschränkt ist, wird in vielen Arbeiten eine stabilisierende Wirkung von PEDF beschrieben (s.o.).

Somit kann PEDF unter Stressbedingungen weitere Eigenschaften haben, die in dieser Arbeit untersucht werden.

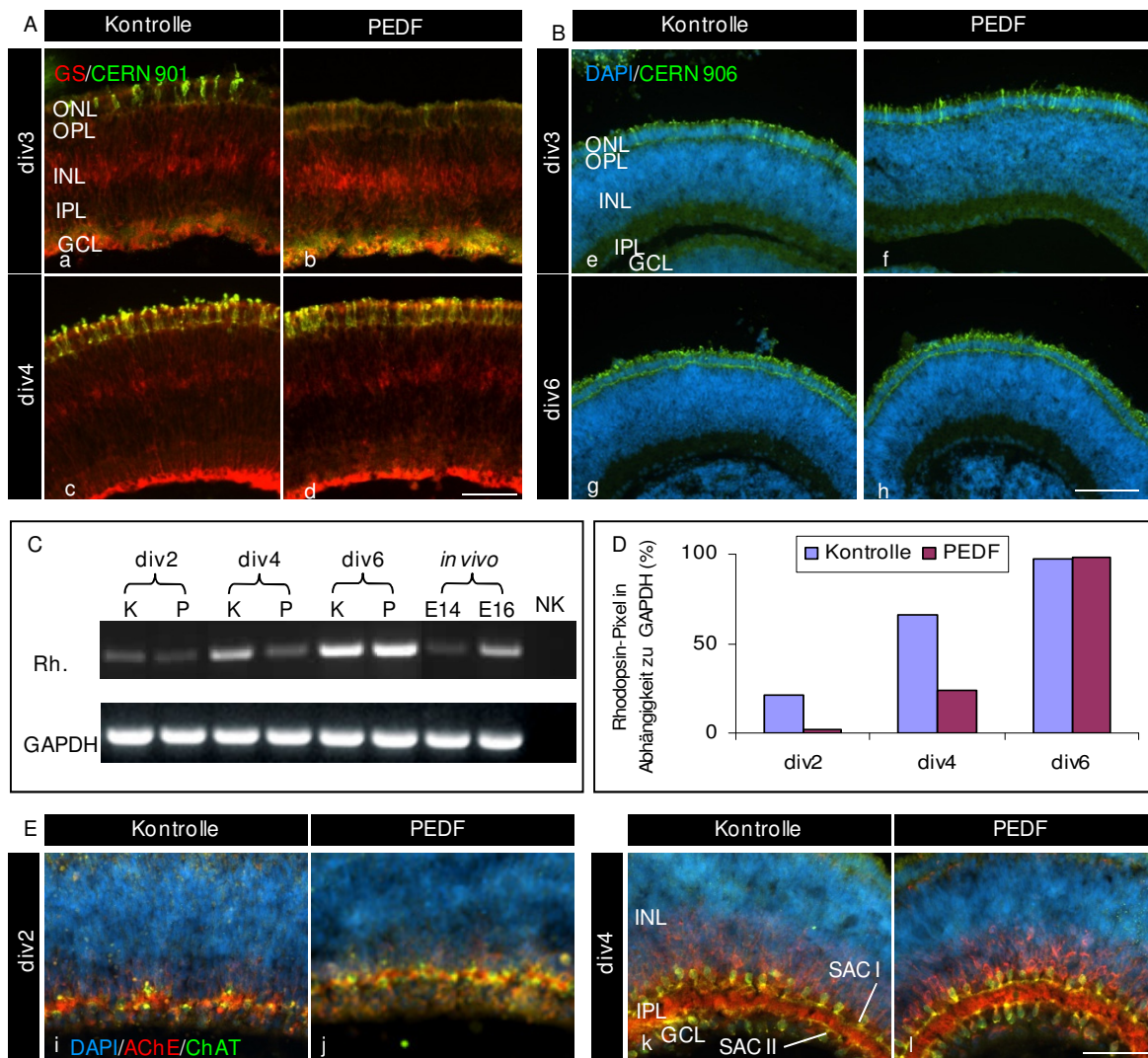


Abbildung 7. PEDF verzögert die Entwicklung der Stäbchen-Photorezeptoren zeigt aber keine Auswirkungen auf die IPL-Entwicklung. Explantate wurden mit PEDF (50 ng/ml) behandelt. Kryoschnitte (div3, 4 und 6) wurden gegen GS (rot), Stäbchen (CERN 901; grün)(A) und Zapfen (CERN 906; grün; B) gefärbt. Beachte die geringe Anzahl an Zapfen unter dem Einfluss von PEDF (A: b) und die leicht beschleunigte Zapfen-Entwicklung in f. Bild C zeigt die gleiche Verzögerung durch PEDF auf mRNA-Ebene. D: grafische Darstellung der Daten aus C mit ImageJ. Die Verzögerung durch PEDF ist bis div4 zu beobachten. E: Kryoschnitte von div2 und div4, gefärbt gegen ChAT (grün) und AChE (rot), zeigen keinen Einfluss von PEDF auf die IPL-Entwicklung oder die Anordnung der SACs (ChAT). Kernfärbung mit DAPI in blau. Rh: Rhodopsin; K: Kontrolle; P: PEDF; NK: Negativkontrolle. Maßstab: 20 µm a-d, i-l; 50 µm e-h.

1.6.3 Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)

GDNF ist ein entfernter Verwandter der TGF- β -Familie (163). Zusammen mit Neurturin, Artemin und Persephin bildet GDNF die Gruppe der *GDNF-family of*

ligands (GFL) (164-167). Sie binden spezifisch an einem der 4 *GDNF-family receptor* α (GFR α)-Rezeptoren. Diese GFR α -Rezeptoren sind über einen Glycosyl-Phosphatidylinositol (GPI) Anker extrazellulär in der Zellmembran verankert. Die Aktivierung der Kaskade beginnt mit der Bindung des GFL an den GFR α -Rezeptor. In Abbildung 8 ist das Zusammenspiel von Ligand und GFR α -Rezeptoren dargestellt (168). Hierbei bindet bevorzugt GDNF an GFR α 1 (169). GFR α 2 ist der direkte Rezeptor für Neurturin, das eine Sequenzhomologie zu GDNF von 44% besitzt (170). Artemin bindet an GFR α 3 und Persephin an GFR α 4 (168). Kreuzreaktionen der Liganden mit anderen GFR α -Rezeptoren wurden bisher nur von Neurturin, Artemin und GDNF berichtet. Neurturin und Artemin besitzen eine geringe Affinität zu GFR α 1 (171) und GDNF zu GFR α 2 (172). Nur Persephin bindet ausschließlich an GFR α 4. Für weitere Informationen siehe Review (168).

Nach der Ligandenbindung bildet GFR α ein Dimer mit Ret. Ret ist ein Transmembranprotein mit cytoplasmatischer Tyrosinkinase-Aktivität (170, 173). Alle GFR α -Rezeptoren geben das Signal an Ret weiter. Studien zeigen allerdings, dass das GDNF-Signal auch in Abwesenheit von Ret weitergegeben wird (168, 173). Durch Ligandenbindung an Ret wird eine Autophosphorylierung von Ret stimuliert (174), was 3 intrazelluläre Kaskaden induziert: MEK/EKR, *stress activated protein kinase* (SAPK) und PKB/AKT (173-174).

GDNF wurde zuerst 1993 lokalisiert, als *growth factor* für das Überleben von embryonalen dopaminergen Neuronen bei der Parkinson Krankheit (175-177). Später zeigte GDNF auch neurotrophe Eigenschaften auf spinale Motoneuronen (178-179) und auf das Überleben von sensorischen Neuronen der Photorezeptoren (180-181). Hierbei schützt GDNF die Photorezeptoren vor lichtinduziertem Zelltod. Speziell das Absterben der Photorezeptoren ist das Krankheitsbild von Retinitis Pigmentosa. Auch auf die Entwicklung von nicht-neuronalen Geweben hat GDNF eine Wirkung gezeigt, z.B. beim Auswachsen der Ureterknospe der Niere (182-183). GDNF ist ein wichtiger Faktor, der in vielen Bereichen der Entwicklung und bei der Erhaltung von neuronalen und nicht-neuronalen Geweben eine Rolle spielt.

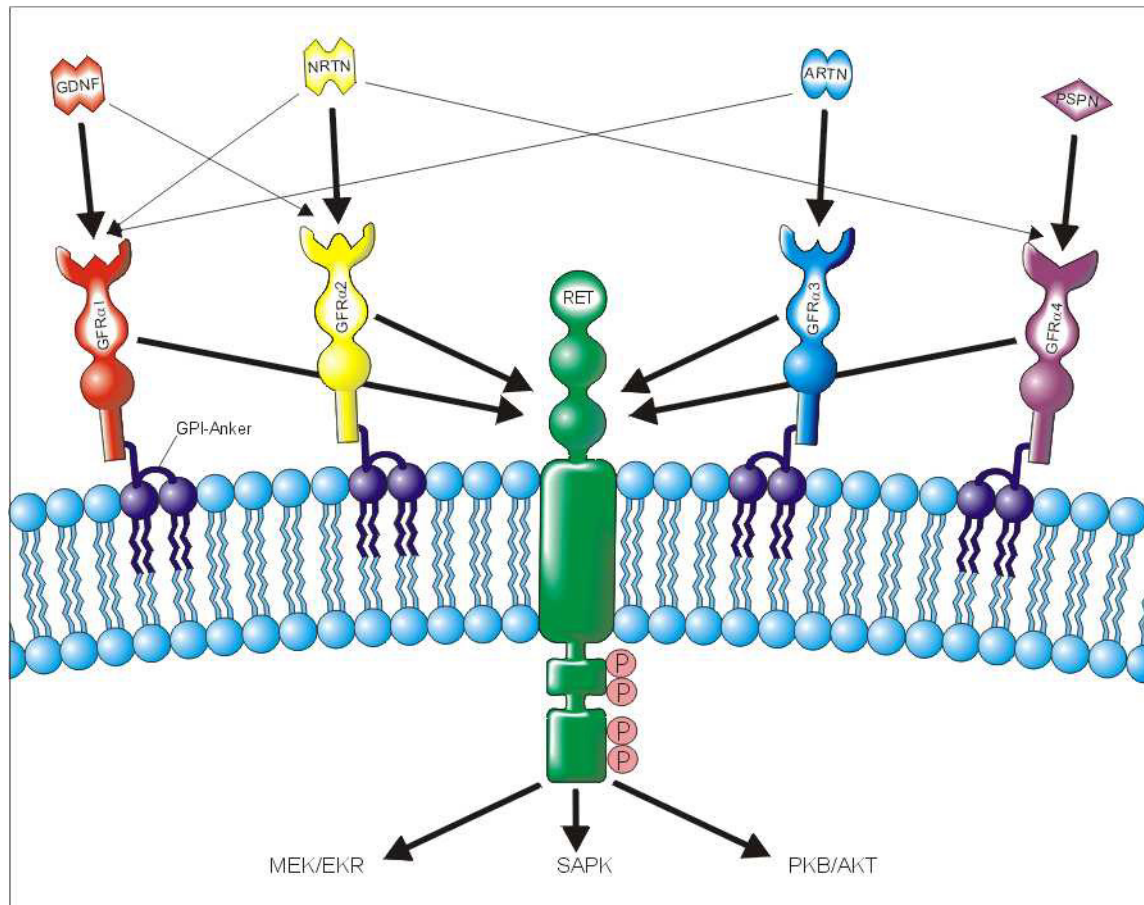


Abbildung 8. Schematische Darstellung der GDNF-family ligands und Rezeptor-Interaktionen. Der *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF)-family receptor- α (GFR α)-Rezeptor aktiviert RET Tyrosin Kinase, nachdem der GDNF-family ligands (GFLs) an den GFR α Rezeptor gebunden hat. Die Pfeile verdeutlichen die Interaktionen von Ligand und Rezeptoren. Hierbei bezeichnen die dickeren Pfeile die bevorzugten Interaktionen und die dünneren Pfeile die Kreuzreaktionen. Die aktivierte RET Tyrosin Kinase überträgt das Signal der GFLs an die MEK/EKR-, SAPK- und PKB/AKT-Signalwege nach Autophosphorylierung. Die GFR α -Proteine sind über einen *glycosyl phosphatidylinositol* (GPI)-Anker auf der extrazellulären Seiten in der Zellmembran verankert. ARTN, Artemin; NRTN, Neurturin; PSPN, Persephin. Nach Airaksinen (2003) (168).

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von Müllerschen Radialgliazellen (MCs) bei der Wirkung der neurotrophen Faktoren GDNF, BDNF und PEDF auf die embryonale Entwicklung der Wirbeltierretina näher zu ergründen. Als Modellsysteme dienten Sphäroide und Explantate aus der embryonalen Hühnerretina. Dabei wurden die Explantate vor allem genutzt, weil sie während ihrer Kultivierung deutlicher alle retinalen Schichten ausbilden.

Der erste Teil dieser Arbeit sollte sich mit der Suche nach geeigneten Methoden und Systemen beschäftigen, mit denen die Rolle der Müllerzellen in retinalem Gewebe und in Reinkultur studiert werden kann. Hierzu sollten reine Müllerzell-Populationen aus retinalem Gewebe erstellt werden, die für die Expressionsstudien (RT-PCR) genutzt werden konnten. Die Reinigung der Müllerzellen sollte möglichst nach kurzer Kultivierungsdauer erreicht werden. Anhand dieser Populationen sollte die Expression relevanter Zytokine und ihren Rezeptoren nachgewiesen werden.

Im zweiten Teil sollte die Wirkung von α -Aminoadipat (AAA) auf Explantate untersucht werden. Dies sollte sowohl auf immunhistochemischer, als auch auf Genexpressionsebene untersucht werden. Es wurde bisher angenommen, dass AAA oxidativen Stress in Müllerzellen erzeugt, was zum Anschwellen (Gliose) und zum Absterben der Müllerzellen führen kann. Dies sollte in dieser Arbeit überprüft und weiter analysiert werden. Hierzu war es erforderlich, eine Methode zu etablieren, die Auskunft über den oxidativen Stress gibt.

Im dritten Teil sollte die Wirkung von relevanten Zytokinen auf reine Müllerzell-Populationen und die Wirkung von α -Aminoadipat (AAA) auf das Expressionsmuster in Müllerzellen untersucht werden. Im letzten Fall sollte insbesondere auf die Expression relevanter Zytokine unter dem Einfluss von AAA geachtet werden. Desweiteren sollte die Wirkung von Zytokinen auf die AAA-behandelten Explantate untersucht werden. Insbesondere sollte eine mögliche Reduzierung der toxischen Wirkung von AAA auf Müllerzellen bestimmt werden. Zur Dokumentation wurden immunhistochemische und molekulare Methoden verwendet.

Mit dieser Studie sollte somit ein Beitrag für das Verständnis geleistet werden, inwieweit Müllerzellen eine Rolle bei der Wirkung von Zytokinen (BDNF, GDNF und PEDF) spielen und inwieweit diese Zytokine durch AAA beeinträchtigte Müllerzellen schützen können.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsort
Polymerase-Puffer	Promega, Mannheim
Acetylthiocholinjodid	Sigma, Deisenhofen
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ascorbat	Sigma, Deisenhofen
BrdU	Sigma, Deisenhofen
BSA	Sigma, Deisenhofen
$C_4H_4O_4$ (Maleinsäure)	Merck, Darmstadt
$C_6H_5Na_3O_7$ (Natriumcitrat)	Merck, Darmstadt
$CuSO_4$	Merck, Darmstadt
DAPI	Merck, Darmstadt
DEPC	Sigma, Deisenhofen
DL- α -Aminoadipat (AAA)	Sigma, Deisenhofen
DNAse	Worthington Biochemical Corp.,USA
dNTP-Mix	Promega, Mannheim
EDTA	Merck, Darmstadt
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Forskolin	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Merck, Darmstadt
HCl	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
K_2SO_4	Merck, Darmstadt
$K_3[Fe(CN)_6]$ (Kaliumhexacyanoferrat(III))	Merck, Darmstadt
Kaiser's Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
KH_2PO_4	Merck, Darmstadt

MgCl ₂	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaAcetat	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
PBS (steril)	GIBCO, Eggenstein
PFA	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Tris	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Merck, Darmstadt

3.1.2 Aggregationsmedium und –Zusätze

Bezeichnung	Bezugsort
DMEM	C•C•Pro, Oberdorfla
FCS (fötales Kälberserum)	Sigma Deisenhofen
Gentamycin (0,02 mg/ml)	Lonza, Berlin
Penicillin (10000 u/ml) /Streptomycin (10000 µg/ml)	Lonza, Berlin
L-Glutamin (200mM)	Lonza, Berlin
F12-Medium	C•C•Pro, Oberdorfla
CS (Hühnerserum)	Gibco, Eggenstein
HBSS	Sigma Deisenhofen

3.1.3 Zusammensetzung der Medien und Pufferlösungen

Reaggregationsmedium	10% FCS 2% CS 1% L-Glutamin 0,1% Penicillin/Streptomycin 0,02 mg/ml Gentamycin in DMEM
Blocklösung	3% BSA 0,1% Triton X-100 in 20 ml 1x PBS
25% Saccharose-Lösung	25 g Saccharose in 100 ml 1x PBS

4% Paraformaldehyd (PFA)	4g PFA in 80 ml 1x PBS mit 10M NaOH lösen, auf pH 11 bringen, mit 37% HCL auf pH 7,3, ad 100 ml 1x PBS
50mM KH_2PO_4	3,4 g KH_2PO_4 mit 2 M HCl auf pH 7,0 in 50 ml H_2O dest.
50mM Na_2HPO_4	4,4 g Na_2PO_4 mit 2 N HCl auf pH 7,0 in 50 ml H_2O dest.
50mM Phosphatpuffer	20 ml 50 mM KH_2PO_4 30 ml 50 mM Na_2HPO_4
Triton X-100 (10%ig)	1 ml Triton X-100 in 10 ml 50 mM Phosphatpuffer
0,3% H_2O_2	1 μl 30% H_2O_2 in 100 μl 50 mM Phosphatpuffer
DEPC H_2O	0,1% DEPC in H_2O bidest. 2x autoklaviert
50 x TAE-Puffer	242 g Tris 57 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ad 1 l H_2O dest.
10x PBS	80 g NaCl (1,37 M) 2 g KCl (27 mM) 11,5 g Na_2HPO_4 (83 mM) 2 g KH_2PO_4 (15 mM) ad 1 l H_2O dest., pH 6,8
1x PBS	50 ml 10x PBS 450 ml H_2O dest.
PBS ^{-/-} pH 7,4	8 g NaCl 0,2 g KCl 0,24 g KH_2PO_4 1,44 g Na_2HPO_4 In 1000 ml H_2O
PBS/EDTA	0,1% EDTA in PBS ^{-/-} Lösen

0,1M Tris-Maleatpuffer pH 6.0	12,2 g Tris 11,6 g Maleinsäure mit 2,5 M NaOH pH 6.0 einstellen in 1000 ml H ₂ O
0,1M Natriumcitrat	7,35 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ x 2H ₂ O in 250 ml dH ₂ O
30mM Kupfersulfat	1,875 g CuSO ₄ x 5H ₂ O in 250 ml dH ₂ O
5mM Kaliumhexyanoferrat	0,41 g K ₃ [Fe(CN ₆)] 250 ml dH ₂ O

3.1.4 Wachstumsfaktoren

BDNF (human)	Biomol
GDNF	Biomol
PEDF	Biomol
bFGF	Sigma, Deisenhofen
EGF	Biomol

3.1.5 Antikörper

Primärantikörper

AChE (3D10; ACB-1)	Karl Tsim	(184-185)
4H6	DSHB	(186)
ChAT	Miles L. Epstein, Wisconsin	(187-190)
Calretinin	Swant, Bellinzona	(191-193)
CERN 901	Dr. Willem J DeGrip, Nijmegen Niederlande	(67, 194)
CERN 906	Dr. Willem J DeGrip, Nijmegen Niederlande	(195-196)
Glutaminsynthetase	BD Biosciences, Heidelberg Transduction	(197)
F11	Dr. T. Brümmendorf, Berlin	(198)
Transitin (EAP3)	DSHB	(199-200)
Pax6	DSHB	(201)
Vimentin (H5)	DSHB	(202)
Visinin (7G4)	DSHB	(203)

Sekundärantikörper

Cy2 goat α rabbit	Dianova, Hamburg
Cy2 donkey α mouse	Dianova, Hamburg
Cy3 donkey α mouse	Dianova, Hamburg
Cy3 donkey α guinea pig	Dianova, Hamburg

3.1.6 Enzyme

Desoxyribonuklease	Worthington Biochemicals/Cell Systems, Remagen
Trypsin	Worthington Biochemicals/Cell Systems, Remagen
Trypsin/EDTA	Gibco, Eggenstein

3.1.7 Primer

GEN	Sequenz	Aniling	bp	ACCESSION
BDNF	sense 5'-AGCCCAGTGAGGAAAACAAGG-3' antisense 5'-CATGTTGCAGCATCCAGGT-3'	51 °C	130	NM_001031616.1
Katalase	sense 5'-CGCTCTTCCTGCTTGGGGGT-3' antisense 5'-TGCAAAGCCTCGAGGGTCACG-3'	68 °C	435	NM_001031215.1
GAPDH	sense 5'-CCTCTCTGGCAAAGTCCAAG-3' antisense 5'-TTGGCTGTCAACATTGAAGTC-3'	59 °C	804	NM_204305.1
GFAP	sense 5'-CATGGGACTGTTCTGACCCT-3' antisense 5'-TCTCGTGTTGCAGTGTTTGG-3'	59 °C	533	XM_418091
GNDF	sense 5'-TGCCAGAGGATTACCCAGAT-3' antisense 5'-AGGTCATCGTCAAAGGCTGT-3'	59 °C	406	XM_425018.2
GFR α 1	sense 5'-TTGACAAAGTTCCCCCAAAG-3' antisense 5'-GATTTCCGCTTCTTCTGTGC-3'	59 °C	616	NM_205102.1
GFR α 2	sense 5'-AGGGGCATGAGAAAGGAGAT-3' antisense 5'-ACCAATGAGCCCTGTGTAGG-3'	59 °C	612	NM_205101.1
GFR α 3	sense 5'-CGGGAACAGCTCTTTACTGC-3' antisense 5'-CTTTCAGGCATGGGTTTGTG-3'	52 °C	236	XM_414669.2
GFR α 4	sense 5'-CAGGGGCTTTGATTATGTCC-3' antisense 5'-AAGCTCTCGCACTCTTCCTG-3'	54 °C	215	NM_204991.1

GLUT1	sense 5'-GAGCGAGGGTTCAGCGGCAG-3' antisense 5'-GCACCTGGGGGAGAAGGGCT-3'	68 °C	540	NM_205209.1
GS 1	sense 5'-CGGCGAGCTCCCACCTGAGCA-3' antisense 5'-CGGAGGTGCTCCCCAGTCCCG-3'	59 °C	112	NM_205493.1
GS 2	sense 5'-GCTCAGTGGGGAAGACTCAG-3' antisense 5'-CCTGCTTTAGTGACGTGCAA-3'	57 °C	229	NM_205493.1
PEDF	sense 5'-GCGCTGAGCCTGCACTGTCC-3' antisense 5'-CGGCTGGATTGCTGGCGGT-3'	68 °C	290	XM_003642400.1
Rhodopsin	sense 5'-ACTCCGGACGCCTCTAAACT-3' antisense 5'-TCCTTCACAGTGACAGACCAG-3'	59 °C	495	NM_001030606.1
SVCT2	sense 5'-CTGCCTGACCCCGTGCTTGG-3' antisense 5'-GGGCTGATGGGCAGGAAGCTG-3'	68 °C	425	NM_001145227.1
TrkB	sense 5'-AATACCATGGCTGCCTTCAG-3' antisense 5'-GGAAACATCCGGAGAAGTGA-3'	59 °C	239	NM_205231.1
Vimentin	sense 5'-TCCAGCACCCGCTATTCCCTGGG-3' antisense 5'-CGCCCAAGCGGGACGTGCCT-3'	60 °C	337	NM_001048076.1

TrkB, GAPDH, GFAP, BDNF, Vimentin, GS (1,2), GDNF, PEDF, GFR α 1, GFR α 2, GLUT1, SVCT2, Katalase: Sigma-Aldrich. Rhodopsin, GFR α 3, GFR α 4 Eurofins mwg operon, Eberberg

3.1.8 Reaktionsansätze / Kits

TopTaq-PCR Kit	Qiagen, Hilden
RevertAid First Strand cDNA-Synthesis Kit	Fermentas, St-Leon-Roth
DeadEnd Fluorometric TUNEL System	Promega
MasterPure Complete DNA RNA Purification Kit	Epicentra Biotechnologies
dNTP Mix (10 μ M)	Bioline, Luckenwald Primer

3.1.9 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

3 MM Whatman-Papier	Whatman, Maidstone
Deckgläser	Merck, Darmstadt
DNA-Molekulargewichtsmarker	Roth, Karlsruhe
Eppendorf-Reaktionsgefäße 0,2, 0,5, 1,5 und 2 ml	Eppendorf, Hamburg

Rothi Liquid Barrier Marker	Roth, Karlsruhe
Hybond Nitrocellulosemembran	Amersham, Braunschweig
Objektträger 76 x 26 mm (Superfrost)	Merck, Darmstadt
Polypropylenröhrchen 12 und 50 ml	Greiner, Frickenhausen
Paraffin	NeoLab, Heidelberg
12-Loch Kulturplatten	Sarstedt, Nümbrecht
Coverslips (15 mm und 20 mm)	VWR, Darmstadt
Deckgläser (24 x 60 mm)	Roth, Karlsruhe
Kulturflaschen	Greiner, Frickhausen
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Objektträger Superfrost Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
PCR-Reaktionsgefäße 200 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen 35 mm Ø	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Greiner, Frickhausen
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml, 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht

3.1.10 Geräte

Analysenwaage (Sartorius)	Biometra, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop: (Axiophot)	Carl Zeiss, Jena
Fluoreszenzmikroskop: (Observer. D1)	Carl Zeiss, Jena
Binokular (Stemi SV11)	Carl Zeiss, Jena
CO ₂ -Inkubator (Heraeus cell 240)	Thermo Scientific, Hanau
Tiefkühlschrank (-80 °C Hera freeze)	Thermo Scientific, Hanau
Densitometer (GS-700)	BioRad, München
Elektrophoreseapparatur	Peqlab, Erlangen
Kryostat (HM 500OM)	Microm, Walldorf
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
pH-Meter (MP 220)	Mettler, Toledo
Schüttler für Rotationskulturen	Eigenbau des MPI
Thermocycler (Pegstar 2x)	Peqlab, Erlangen
Spektrophotometer (Nanodrop 2000c)	Thermo Scientific, Hanau
Spannungsgeräte	Biometra, Göttingen

Sonotrode für Zellaufschluss (Sonoplus GM 70)	Bandelin, Berlin
Spektralphotometer UV/VIS (BioMeter3)	Thermo Scientific, Hanau
Sterilbank (Herasafe)	Thermo Scientific, Hanau
Flow	Thermo Scientific, Hanau
UV-Transluminator	Peqlab, Erlangen
Vortexgeräte	IKA Labortechnik, Staufen
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifuge für 15 und 50 ml Reaktionstubes	Hermle, Wehingen
Kühlzentrifuge für 1,5 – 2 ml Reaktionstubes	Hermle, Wehingen

3.1.11 Software

ImageJ 1.41o	Freeware
AxioVision V 4.7.1.0	Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH
Microsoft Office 2007	Microsoft
EndNote x3	Freeware

3.1.12 Versuchstiere

Als Versuchsobjekte dienten Eier der Haushuhnrasse *White Leghorn* (*Gallus gallus domesticus*). Die befruchteten Eier wurden über den Geflügelvermehrungsbetrieb LSL-Rhein-Main in Dieburg bezogen.

3.2 Methoden

3.2.1 Lagerung und Bebrütung der Eier

Die befruchteten Eier der Haushuhnrasse *White Leghorn* werden über den LSL-Rhein-Main Dieburg bezogen. Bis zur Bebrütung werden die Eier bei 14°C gelagert. Die Bebrütung der Eier erfolgt in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C und einer Luftfeuchtigkeit von 85%. Während der Bebrütung werden die Eier jede dritte Stunde gewendet. Die entsprechenden Entwicklungsstadien wurden nach den Richtlinien von Hamburger und Hamilton bestimmt und in dieser Dissertation als embryonaler Tag (E) benannt (204).

3.2.2 Präparation embryonaler Augen

Eine entsprechende Anzahl an Eiern wird wie beschrieben inkubiert und zum gewünschten Stadium präpariert. Bei der Entnahme aus dem Inkubator ist darauf zu achten, dass die Eier nicht mehr gewendet werden, da der Embryo sich am obersten Punkt des Eies befindet. Alle Präparationen sollten unter sterilen Bedingungen erfolgen. Aus diesem Grund werden alle Eier vor der Öffnung mit 70% Ethanol eingesprüht. Mit einer abgerundeten Pinzette werden die Eier an der stumpfen Seite angestochen und an der oben liegenden Flanke geöffnet. Durch das seitliche Öffnen der Eier kann die Luft aus der Luftkammer entweichen. Das Eimaterial sinkt beim seitlichen Anstechen ab und liefert Platz für ein problemloses Öffnen der Eier. Der Embryo wird am Schalenrand oder mit einer gebogenen Pinzette dekapitiert. Die einzelnen Köpfe werden in kaltem F12 gesammelt. Für das Herauslösen der Augen werden die Köpfe mit einer geraden Pinzette fixiert und das Auge mit einer gebogenen Pinzette herausgeschält. Die Augen werden auf Eis in F12-Medium gesammelt. Der Rest des Embryos wird verworfen. Die weitere Verarbeitung der Augen wird in den folgenden Abschnitten erläutert (205).

3.2.3 Herstellung von Rosettensphäroiden (Huhn)

Die in kaltem F12-Medium gesammelten Augen aus Gliederungspunkt 3.2.2 werden für die Herstellung von Rosettensphäroiden einzeln in *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) überführt und präpariert. Um die Retina zu isolieren, wird das

Auge entlang der *Ora serrata* geöffnet. Der pigmentierte Ring wird samt Linse und Glaskörper mit einer gebogenen Pinzette aus dem Auge gezogen. Die Retina liegt nun auf der Innenfläche des Pigmentepithels im geöffneten Auges. Durch Ca^{2+} -freies-Medium HBSS lässt sich die Retina leicht vom Pigmentepithel lösen. Die isolierte Retina wird in kaltem F12 gesammelt. Nach der Präparation wird die gesammelte Retina bei 900 rpm für 8 min pelletiert. Nach der Zentrifugation wird das Retinapellet in 2 ml Trypsinlösung (1 mg/ml) aufgeschüttelt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Reaktion löst die Zell-Zellkontakte und hilft bei der späteren Vereinzelung. Die Trypsinreaktion wird mit 8 ml Reaggregationsmedium abgestoppt. Nach der Pelletierung werden die Zellen dreimal mit 8 ml kaltem F12 gewaschen und jeweils nach Aufschütteln in frischem F12 erneut pelletiert. Durch das dreimalige Waschen mit F12 werden die Reste von Trypsin bis zur Unwirksamkeit verdünnt. Anschließend wird das Retinapellet mit 2 ml DNase1-Lösung (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) vermischt. Mit einer Pasteurpipette, die an der Öffnung mit Hitze entgratet und im Durchmesser verengt wurde, werden die Retinazellen durch 20-30 maliges Auf- und Abziehen vereinzelt. Daraufhin werden die Zellen in der DNase-Lösung für 10 min bei RT inkubiert. Durch das mechanische Vereinzeln wird ein gewisser Anteil an Zellen zerstört. Austretende DNA kann ohne DNaseverdau zu einer unerwünschten Vernetzung der Zellen führen, sodass sich die gesamte Zellmasse zu einem Zellaggregat zusammenschließt. Der Grad der Vereinzelung wird mikroskopisch überprüft. Gestoppt wird die DNase-Reaktion mit 8 ml kaltem F12. Das Zellmaterial wird wie zuvor dreimal mit F12 gewaschen und bei 800 rpm 5 min zentrifugiert. Im letzten Schritt wird der Überstand gründlich abgezogen und das Zellenpellet im Verhältnis von 100 $\mu\text{l}/\text{Ei}$ in Reaggregationsmedium gelöst. Diese Verdünnung entspricht ungefähr einer Zellzahl von $1,2 \times 10^6$ Zellen (205).

3.2.4 Ansetzen der Rosettensphäroid-Kulturen

Die in Gliederungspunkt 3.2.3 erstellte Zellsuspension wird für die Kultivierung in 2 ml Medium mit Reaggregationsmedium 1:20 verdünnt. Hierzu werden 1900 μl Reaggregationsmedium in den Kulturschalen (Durchmesser 35 mm) vorgelegt und 100 μl Zellsuspension zugeführt. Für die Behandlung mit Wachstumsfaktoren wird die Menge einzelner Faktoren, die in unterschiedlichen Konzentrationen (siehe

Tabelle 1) benötigt werden, bei der Vorlage des Reaggregationsmediums berücksichtigt. Die Kontrollkulturen enthalten ausschließlich das Reaggregationsmedium. Bei Behandlungen mit AAA wird die entsprechende Verdünnung von AAA durch Zugabe der Zellsuspension in der Kulturschale vorgelegt. Das Volumen der Zellsuspension wird hierbei von der Anzahl des Reaggregationsmediums abgezogen.

Wachstumsfaktoren	Konzentration
GDNF	50 ng/ml
BDNF	10 ng/ml
PEDF	50 ng/ml

Tabelle 1 Eingesetzte Konzentrationen der verwendeten Wachstumsfaktoren.

Die angesetzten Kulturen werden im Brutschrank bei 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit und 37°C unter permanenter horizontaler Rotation (75 rpm) bebrütet. Das Reaggregationsmedium wird jeden zweiten Tag gewechselt, wobei zu den behandelten Rosettensphäroiden der entsprechende Wachstumsfaktor oder Toxin (AAA) bei jedem Mediumwechsel erneut zugegeben wird.

3.2.5 Explantat-Kultur

Für Explantat-Kulturen wurden Eier am entsprechenden embryonalen Tag (meist E6), wie unter Gliederungspunkt [3.2.2](#) beschrieben, geöffnet und die Augen in kaltem F12 gesammelt. Für die Präparation der Explantate wurden die Augen einzeln in calciumfreies HBSS überführt. Mit einer feinen Schere wurde das Auge entlang der Ora serrata geöffnet (Abbildung 9) und der gesamte ausgeschnittene Bereich, samt Linse und Glaskörper, mit einer feinen Pinzette aus dem Auge gehoben. Als nächstes wurde die gesamte Retina vorsichtig in einem Stück vom RPE getrennt. Hierbei unterstützt die Eigenschaft des calciumfreien HBSS die Abtrennung der Retina vom Pigmentepithel. Der Retina-`Becher´ wurde mit einer feinen Schere in zwei gleiche Teile geschnitten, sodass die Teilung durch den zentralen Bereich der Retina verläuft. Der zentrale Bereich ist an der `Becher´-Außenseite durch den Rest des Sehnervs gekennzeichnet. Die einzelnen Explantate wurden in das entsprechende Medium überführt und bis zur Fixierung

im Brutschrank bei 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit und 37°C unter permanenter horizontaler Rotation (75 rpm) bebrütet.

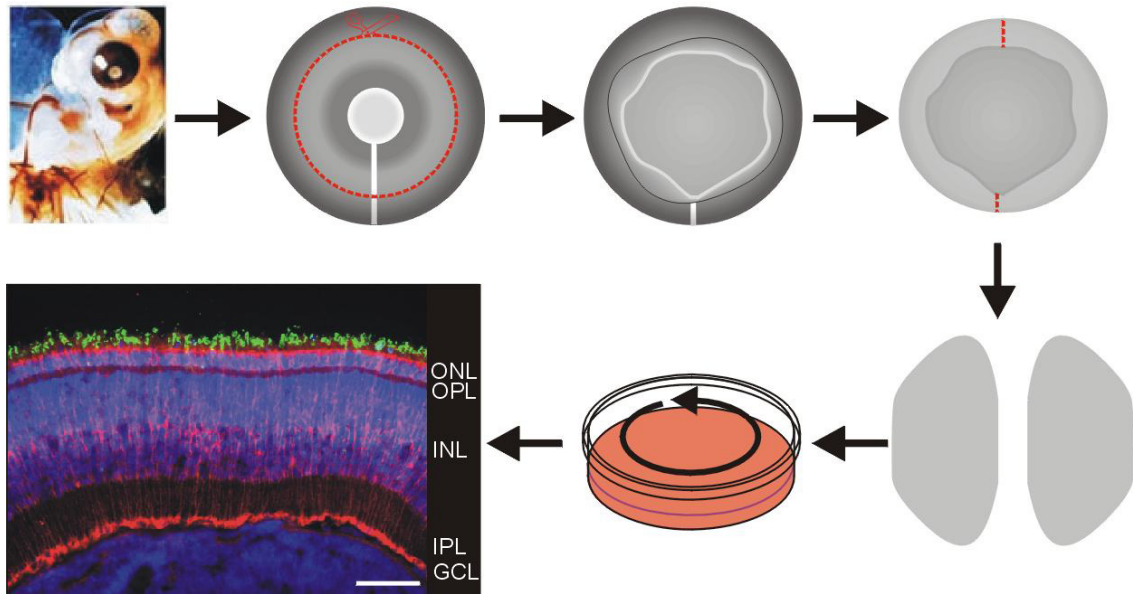


Abbildung 9. Schematische Darstellung des Verfahrens zur Herstellung von Explantaten aus einem E6-Hühnerembryo. Die Augen des E6-Embryos wurden entfernt und der gesamte Retina-`Becher` wurde isoliert, ohne dass Pigmentepithel an der Retina hafteten. Die Retina wurden in zwei gleiche Teile geschnitten und in 35 mm Schalen mit Medium kultiviert ohne weiteres Substrat zu verwenden. Die konstante horizontale Rotation (72 rpm) führt zum Wachstum von retinalen Explantaten in einer 3D-ähnlichen Umgebung.

3.2.6 Herstellung von Müllerzell-Monolayer in Kulturflaschen und auf *cover slips*

Für einen Müllerzell-Monolayer wird eine Zellsuspension erstellt, die wie unter 3.2.3 beschrieben gewonnen wird. Die Aussaat erfolgt in T25 Zellkulturflaschen mit 200 µl Zellsuspension in 4 ml Reaggregationsmedium. Das entspricht einer ungefähren Zellzahl von $2,5 \times 10^6$ Zellen. Für Monolayer-Kulturen auf Glas *cover slips* in einer 12 Lochplatte (1ml pro *well*), wird ein entsprechend geringeres Volumen eingesetzt. Eine entsprechende Behandlung von retinalen Mischkulturen kann direkt nach der Aussaat begonnen werden.

Für Experimente mit reinen Müllerzell-Kulturen müssen vor Beginn einer Behandlung alle Neuronen entfernt werden. Hierzu werden zwei Methoden kombiniert: einfaches Abschütteln und gezieltes Abtöten der Neuronen. Um möglichst schnell und effizient an reine Müllerzell-Kulturen zu gelangen, werden die Kulturen nur zwei Stunden als Standkultur gehalten (5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit und 37°C). In dieser Zeit setzen sich die Zellen am Boden des

Kulturgefäßes ab. Neuronen sind bei den verwendeten Kulturflaschen nicht in der Lage am Boden fest zu wachsen, hierzu benötigen sie Müllerzellen als Bindungspartner. So kommt es, dass alle Neuronen auf der Oberfläche von Müllerzellen sitzen, welche den Flaschenboden besiedeln. Nach zwei Stunden Standkultur werden die Kulturen unter permanenter horizontaler Rotation weiter kultiviert. Durch die Rotation werden die Neuronen mit der Zeit von den am Kulturgefäßboden sitzenden Müllerzellen heruntergeschüttelt. Diese Kultivierungsweise wird, mit einem regelmäßigen Medienwechsel (alle 2 Tage), bis Kulturtag acht fortgesetzt. Die Beseitigung der Neuronen wird durch Zugabe von 2 mM Ascorbat für 24 h massiv beschleunigt. Dieser Effekt wird unter Gliederungspunkt 4.1.3 näher erläutert. Die Müllerzellen überleben die Ascorbat-Behandlung, aber alle Neuronen sterben ab und lassen sich leicht abschütteln. Alle Behandlungen und Fixierungen von Müllerzell-Monolayern werden am Tag 9 nach Behandlung mit Ascorbat und Medienwechsel begonnen.

3.2.7 Gewinnung von Müllerzell-konditioniertem Medium

Für diese Methode sind reine Müllerzell-Kulturen, die einen nahezu konfluenten Zellrasen gebildet haben, Voraussetzung. Die Gewinnung von reinen Müllerzell-Kulturen wird nach dem Gliederungspunkt 3.2.6 durchgeführt. Beim Mediumwechsel wird das verbrauchte Medium gesammelt und durch frisches Medium ersetzt. Um Zellen, die sich vom Kulturgefäßboden abgelöst haben, aus dem Überstand zu entfernen, findet eine Zentrifugation mit 1000 rpm für 10 min statt. Der Überstand wird in ein frisches 50 ml Falcon überführt und bei -20°C gelagert. Es besteht die Möglichkeit, die Konditionierung unter serumfreien Bedingungen durchzuführen, indem vor einer Überstandskonditionierung das normale serumhaltige Reaggregationsmedium durch serumfreies Medium ausgetauscht wird. Für die verwendeten Methoden in dieser Arbeit reichte eine einfache serumhaltige Mediumkonditionierung aus (205).

3.2.8 Passage von Müllerzellen

Die Passage erfolgt, sobald die Müllerzellen konfluent gewachsen sind. Müllerzellen in dieser Kulturweise sind nicht in der Lage mehrere Zellschichten auszubilden. Sie lösen sich in großen Zellverbänden vom Kulturgrund ab, sobald

der Flaschenboden vollständig bewachsen ist. Damit diese Reaktion verhindert wird, ist eine Passage unersetzlich. Das verbrauchte Medium wird entfernt und gegebenenfalls als konditioniertes Medium verwendet. Die Zellen werden mit sterilem 1xPBS^{-/-} einmal gewaschen. Anschließend werden 3 ml PBS/EDTA (0,04% EDTA in 1xPBS^{-/-}) für etwa 30 sek nach Entfernen des PBS^{-/-} zugegeben. Unter dieser Behandlung lösen sich die Ca²⁺-abhängigen Zell-Zell-Kontakte, welche die Vereinzelung der Müllerzellen unterstützt. Eine Behandlung mit Trypsin/EDTA (0,1% Trypsin, 0,04% EDTA in HBSS) löst die Zellen vom Kulturboden ab. Mit einer entgrateten Pasteurpipette lassen sich die letzten Zellverbände vom Kulturboden lösen und gleichzeitig durch das Auf- und Abpipettieren die Zellklumpen dissoziieren. Die Reaktion wird nach 3 min bei RT mit 3 ml Reaggregationsmedium gestoppt. Die Zellsuspension wird in einem frischen Falcon gesammelt und bei 900 rpm pelletiert. Das Pellet wird in 200 µl pro passagierte Flasche gelöst. Die Zellsuspension wird 1:40 mit frischem Reaggregationsmedium verdünnt und in frische T25 Kulturflaschen gegeben. Die weitere Kultivierung erfolgt, wie beschrieben, als Standkultur bei 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit und 37°C (205).

3.2.9 Herstellen von Stratosphäroiden

Die Präparation von Retinazellen für Stratosphäroid wird nach Vorgaben von 3.2.4 durchgeführt. Im Unterschied zu normalen Sphäroiden zeigen die Stratosphäroide eine hohe Organisation der retinalen Strukturen, die vergleichbare laminare Schichten aufweisen wie die *in vivo*-Retina. Für diese Methode wird ein konditioniertes Medium benötigt, wie es unter Gliederungspunkt 3.2.7 beschrieben wird. Das konditionierte Medium wird 1:1 mit frischem Reaggregationsmedium eingesetzt. 5-10% der Aggregate zeigen nach 2-3 Tagen eine deutlich andersartige radiäre Struktur (Abbildung 10). Wie für die Sphäroide wurde jeden zweiten Tag das Medium ausgetauscht. Das konditionierte Medium ist nach Kulturtag sechs nicht mehr nötig, da die Stratosphäroide ihre Struktur in normalem Reaggregationsmedium nicht mehr verändern (205).

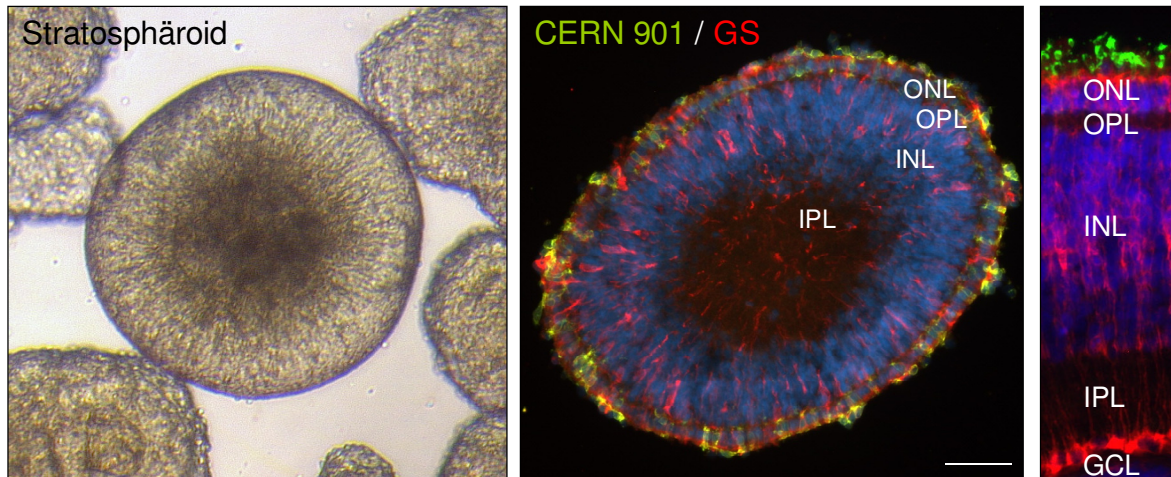


Abbildung 10. Darstellung von Stratosphäroiden. In a ist ein Stratosphäroid im Durchlicht dargestellt. Bild b zeigt eine Stratosphäroid-Kryoschnitt gefärbt gegen Müllerzellen (GS) und Stäbchen-Photorezeptoren (CERN 901). In c ist ein Kryoschnitt von einem div17 Explantat dargestellt (gefärbt wie b). Maßstab: 50 µm.

3.2.10 Zellfixierung auf *cover slips* und 3D-Kulturen und Herstellung von Gefrierschnitten

3.2.10.1 Fixieren von *cover slips*

Auf Glasdeckgläschen (*cover slips*) sind die Müllerzellen oder retinale Mischkulturen bis zu einem gewünschten Zeitpunkt kultiviert worden. Für die Fixierung wird das Medium gründlich aus den einzelnen *wells* entfernt und dreimal mit 1 ml sterilem 1xPBS gewaschen. Anschließend erfolgt die Fixierung mit 4%igem PFA für 30 min bei RT. Überschüssiges PFA wird entfernt und die *cover slips* zweimal mit 1xPBS gewaschen. Bis zur Färbung werden die *cover slips* in sterilem 1xPBS bei 4 °C gelagert.

3.2.10.2 Fixierung von embryonalen Augen für Gefrierschnitte

Präparierte Augen, wie unter Gliederungspunkt 3.2.2 beschrieben, werden nach dem Herauslösen aus dem Kopf in 1xPBS gesammelt und dreimal für jeweils 10 min bei RT mit sterilem 1xPBS gewaschen. Anschließend erfolgt eine Fixierung mit 4%igem PFA für 30 min bei RT. Das restliche Fixativ wird durch dreimaliges Waschen mit sterilem 1xPBS entfernt. Zuletzt wird das PBS entfernt und durch 25%ige Saccharose ersetzt. Die Präparate können geschnitten werden, sobald sich das Präparat mit der Saccharose vollgesogen hat und zum Gefäßboden

gesunken ist. Während der Fixierung zieht sich der Glaskörper im Auge zusammen. Um diesen Effekt entgegen zu wirken, wird die Umstellung auf 25% Saccharose bei älteren Stadien schrittweise durchgeführt.

3.2.10.3 Fixieren von Stratosphäroiden, Rosettensphäroiden und Explantaten für Gefrierschnitte

Die erstellten Stratosphäroide (3.2.9), Rosettensphäroide (3.2.4) und Explantatkulturen (3.2.5) werden zum jeweiligen Kulturtag mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in 1,5 ml Tubes gesammelt und dreimal mit sterilem 1xPBS für 10 min gewaschen. Die Fixierung erfolgt für 30 min in 4%igem PFA bei RT. Im Anschluss daran werden die Präparate dreimal mit sterilem 1xPBS gewaschen. Im letzten Schritt wird das 1xPBS entfernt und durch 25%ige Saccharose ersetzt. Die Lagerung erfolgt bei 4°C. In dieser Zeit saugt sich das Gewebe mit der Saccharose voll und die Präparate sinken auf den Grund der Tubes.

3.2.10.4 Herstellung von Horizontalschnitten embryonaler Retina

Sobald die in Gliederungspunkt 3.2.10.2 fixierten Augen im Tube abgesunken sind, können sie zur Herstellung von Horizontalschnitten verwendet werden. Für eine natürlich runde Form des Auges wird 25%ige Saccharose in den eingefallenen Intravitrealraum injiziert. Zur Herstellung von Gewebeschnitten mittels eines Gefriermikrotoms (Kryostat) werden die in 25%ige Saccharose eingelegten Augen in eine Kryoform überführt und ausgerichtet. Die Horizontalschnitte sollten im Idealfall Linse und Sehnerv vorweisen. Die überschüssige Saccharose muss nach der Ausrichtung des Auges entfernt werden, da sich sonst die Schnitteigenschaften verschlechtern. Das Auge wird zuletzt eingefroren (-28°C), nachdem es mit Tissue-Tek überzogen ist. Der gefrorene Block wird in einem Tropfen Tissue-Tek auf den Objektisch gedrückt und so auf dem Objektisch fixiert. Nachdem der Block festgefroren ist, wird das ganze Präparat mit Tissue-Tek überzogen, sodass das Auge vollständig mit einer ca. 2 mm dicken Schicht Tissue-Tek überzogen ist. Das eingefrorene Präparat wird nun in den Kryostaten in entsprechender Orientierung eingespannt. Mit der Trimmfunktion (40-50 µm dicke Schnitte) wird das Auge solange geschnitten bis ein Schnitt die Regionen der Linse und des optischen Nervs enthält. Überprüft

wird dies mit genauem Augenmaß und über Mikroskopie. Verwertbare Schnitte von 12 µm Dicke aus der beschriebenen Region des Auges werden auf gelatinierte Objektträger mit einer Schnittdicke von 12 µm aufgenommen. Die Schnittpräparate werden bis zur Färbung bei –20 °C gelagert.

3.2.10.5 Herstellung von Gefrierschnitten von Rosettensphäroiden

Im Unterschied zum Auge werden die Sphäroide in 25%ige Saccharose belassen. Die in Gliederungspunkt 3.2.10.3 fixierten Sphäroide werden mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in einem möglichst kleinen Volumen aufgenommen (ca. 30 µl). Die aufgezogenen Sphäroide werden auf ein vorher angefertigtes Tissue-Tek Plateau als schmaler Tropfen aufgebracht. Es ist hilfreich die Pipettenspitze vor dem Gebrauch ein- bis zweimal mit 25%ige Saccharose zu spülen, da in manchen Fällen viele Sphäroide an der Pipettenoberfläche hängen bleiben könnten. Während der sphäroidhaltige Tropfen gefriert (bis –28 °C), sinken die Sphäroide zu Boden, sodass die Anzahl der Sphäroide im unteren Teil des Tropfens wesentlich höher ist als im oberen Teil. Daher werden über die Trimmfunktion des Kryostaten (40-50 µm Schnittdicke) alle Schnitte des oberen Abschnittes verworfen. Sobald die sphäroidhaltige Region erreicht ist, werden die Schnitte (12 µm Dicke) auf gelatinierte Objektträger aufgenommen und bei –20 °C gelagert.

3.2.10.6 Herstellung von Explantat-Gefrierschnitten

Die fixierten Explantate aus Gliederungspunkt 3.2.10.3 werden wie Augenpräparate in Kryoformen überführt. Die überschüssige Saccharose wird entfernt und das Präparat mit Tissue-Tek überzogen. Die Explantate weisen eine längliche Stabform auf, was die Ausrichtung erheblich vereinfacht. Gewünscht sind Schnitte, die einen Querschnitt durch den Stab zeigen. Die Explantate werden mit einer gebogenen Pinzette oder einer dünnen Pipettenspitze parallel angeordnet, sodass alle Explantate einer Probe gleichzeitig angeschnitten werden. Der Tissue-Tek Block mit dem eingebetteten Explantat wird nach Gefrieren (–28 °C) in einen Tropfen Tissue-Tek auf den Objektstisch gedrückt und mit Tissue-Tek überzogen. Es ist wichtig, dass die Explantate komplett in Tissue-

Tek eingehüllt sind, um eine gute Schnittqualität zu erreichen. Der Objekttisch mit dem Präparat wird nach dem Gefrieren in den Kryostaten eingespannt und mit der Trimmfunktion des Kryostates (40-50 µm Schnittdicke) geschnitten, bis Schnitte vom mittleren Abschnitt des Explantat-Stabes erzeugt werden. Diese Schnitte werden auf gelatinisierten Objektträgern aufgenommen und bis zur Färbung bei – 20 °C gelagert.

3.2.11 Immunhistochemische Färbungen

Antikörper sind hochspezifische Biomoleküle, die in der Lage sind, kleine Strukturen (Epitope) auf der Oberfläche von Zellen oder Proteinen zu erkennen. Diese Eigenschaft wird in der Immunhistologie ausgenutzt, um ein Antigen spezifisch in der Zelle zu detektieren und die Zellen in einem Gewebeverband wie der Retina zu lokalisieren. Bei der Betrachtung von verschiedenen Entwicklungsstadien ist es durch diese Methode möglich, Informationen über die Aufgabe eines Proteins in der Zelle zu einem bestimmten Entwicklungsstadium zu gewinnen. Der Primärantikörper ist spezifisch gegen das Antigen gerichtet. Damit eine Detektion im Fluoreszenzmikroskop möglich wird, ist ein zweiter Antikörper nötig (Sekundärantikörper), der gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Der Sekundärantikörper ist mit einem Fluorochrom modifiziert, das bei einer bestimmten Wellenlänge Fluoreszenz abgibt. Hierbei handelt es sich somit um einen indirekten Nachweis. In Abbildung 11 wird ein Schema gezeigt, das den Aufbau dieser Methode verdeutlicht. In dieser Arbeit werden verschiedene Antikörper verwendet, mit deren Hilfe bestimmte Proteine und ihre Verteilung im retinalen Gewebe lokalisiert und identifiziert werden können.

Vor jeder Immunfärbung werden ausgewählte Schnitte auf einem Heizblock bei 37 °C getrocknet. Das Areal mit den Schnitten wird mit einem Liquid Blocker umrandet. Die Umrandung minimiert die zu färbende Fläche und somit auch die Menge an einzusetzendem Antikörper. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen des Gewebes an den Antikörper wird das umrandete Areal mit einer Blocklösung behandelt (3% BSA + 0,1% Triton-X in 1xPBS). Durch BSA werden unerwünschte Bindungspartner im Gewebe blockiert. Triton erhöht die Membranpermeabilität der Schnitte, sodass intrazelluläre Antigene vom Antikörper erreicht werden konnte.

gegeben und für 70 min bei RT bzw. ÜN bei 4 °C inkubiert. Auf die Inkubation des Primärantikörpers folgt dreimaliges Waschen mit 1xPBS für 10 min. Die Verwendung der Sekundärantikörper richtet sich nach dem verwendeten Primärantikörper. Angaben zur Verdünnung der Sekundärantikörper sind in Tabelle 3 zu finden. Die Sekundärantikörper werden wie die Primärantikörper in Blocklösung verdünnt und auf die Schnitte gegeben. Die Kombination der Sekundärantikörper richtet sich nach den jeweiligen Primärantikörpern. Diese werden 60 min bei RT inkubiert. Um eine vorzeitige Reduktion der Signalstärke zu vermeiden, werden alle Schritte nach Zugabe des Sekundärantikörpers in dunklen Kammern durchgeführt. Es folgen zwei weitere Waschschritte mit 1xPBS für jeweils 10 min.

Bei Färbungen von *cover slips* werden die gleichen Färbeprotokolle verwendet. Die Block- und Färbelösungen werden lediglich auf Paraffin gegeben, der *cover slip* mit den fixierten Zellen auf die Lösung gelegt und in diesem Zustand inkubiert. Durch die flexiblen Eigenschaften von Paraffin konnte der *cover slip* leicht von Paraffin gehoben werden. Für die Waschschritte werden die Glas *cover slips* in einem selbst gebauten Ständer und in ein 1xPBS Bad für 10 min gestellt. Für den nächsten Waschschritt wird die 1xPBS-Lsg. ausgetauscht. Zur Kontrolle der Sekundärantikörper werden Testpräparate ohne Primärantikörper, unter Verwendung der selben Färbeprotokolle gefärbt.

Antikörper	Antigen	Spezifität	Herkunft	Verdünnung	Inkubationsdauer
3D10	AchE	MK	Maus	1:200	ÜN 4 °C
4H6	Neurofilament	MK	Maus	1:250	70 min RT
ChAT	ChAT	PK	Kaninchen	1:1500	ÜN 4 °C
Calretinin	Calretinin	PK	Kaninchen	1:1500	70 min RT
CERN 901	Rhodopsin	PK	Kaninchen	1:1500	70 min RT
CERN 906	r/g-Opsin	PK	Kaninchen	1:2000	70 min RT
GS	GS	MK	Maus	1:200	70 min RT
F11	F11	PK	Kaninchen	1:20	ÜN 4 °C
Pax6	Pax6	MK	Maus	1:500	70 min RT
VIM 3B4	Vimentin	MK	Maus	1:500	70 min RT

Tabelle 2 Eingesetzte Erstantikörper mit verwendeten Verdünnungen und Inkubationszeiten. Abkürzungen: MK: Monoklonal, PK: Polyklonal, RT: Raumtemperatur, ÜN: über Nacht.

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Inkubation
Cy2 goat α rabbit	Ziege	1:200	60 min RT
Cy2 donkey α mouse	Maus	1:200	60 min RT
Cy3 donkey α mouse	Esel	1:200	60 min RT
Cy3 donkey α guinea pig	Esel	1:200	60 min RT

Tabelle 3 Eingesetzte Zweitantikörper mit verwendeten Verdünnungen und Inkubationszeiten. Abkürzungen: RT: Raumtemperatur

3.2.12 Zellkernfärbung mit DAPI

Im Anschluss an die immunhistochemische Färbung erfolgt eine Zellkernfärbung der Präparate. Dafür wird 100 μ l DAPI-Lsg. (0,1 μ g/ml) für 3 min bei RT auf die Schnitte gegeben. Für DAPI-Färbungen von *cover slips* wird 30 μ l DAPI-Lsg. auf einen Paraffinstreifen gegeben und der *cover slip* mit den Zellen auf die DAPI-Lsg. gelegt (3 min bei RT). Nach der DAPI-Färbung werden die Präparate einmal mit 1xPBS gewaschen. PBS ist eine Lösung aus verschiedenen Salzen, die bei dem Eintrocknen Kristalle auf den Präparaten hinterlassen. Um diesen Effekt zu vermeiden, wird als letzter Schritt, vor der Trocknung auf der Wärmeplatte (37°C), das Präparat vorsichtig in dest. H₂O dest. geschwenkt. Die getrockneten Präparate werden mit Kaiser's Glyceringelatine und mit einem Deckglas eingedeckt. Die gefärbten Präparate sind nach dem Abkühlen der Gelatine bereit für die Auswertung und können in lichtundurchlässigen Boxen längere Zeit aufbewahrt werden.

3.2.13 Proliferationsnachweis mittels BrdU-Inkorporationsstudien

Bromodeoxyuridin (BrdU) ist ein synthetisches Thyminanalogon, dass von den Zellen bei der Duplikation des Genoms als Thymin eingebaut wird. Mit Hilfe einer Antikörperfärbung gegen BrdU können so proliferierende Zellen detektiert werden. Hierzu ist es erforderlich, dass das Thyminanalogon (BrdU) 16 Stunden vor der Fixierung ins Reaggregationsmedium in einer Konzentration von 25 μ M zugegeben wird. Die Fixierung und Weiterverarbeitung zu Kryoschnitten erfolgt, wie unter Gliederungspunkt 0 beschrieben. Die Färbung ist ähnlich wie in Gliederungspunkt 3.2.11 beschrieben. Die Schnitte werden allerdings nach der

Trocknung mit 2 M HCl für 10 min bei RT behandelt. Dieser Schritt dient der Permeabilisierung der Zellmembran und der Zellkernmembran. Es folgen drei, je 10 min dauernde, Waschschrte mit 1 x PBS und anschließender Antikörperfärbung nach dem bereits unter Gliederungspunkt 3.2.11 beschriebenen Protokoll. Details zu BrdU sind in Tabelle 2 (Gliederungspunkt 3.2.11 und 3.1.5) zu finden. Die Schnitte werden nach der Trocknung mit Kaiser's Glyceringelatine gedeckelt.

3.2.14 Zelltod-Detektion mit Hilfe des TUNEL-Test

Zelltodbestimmungen werden mit dem *Dead End Fluorometric TUNEL System Kit* von Promega durchgeführt. Hierbei werden Doppelstrangbrüche in der DNA markiert und können mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs detektiert werden. Hierzu werden getrocknete Schnitte in einer Permeabilisierung-Lsg. für 5 min RT inkubiert. Eine Umrandung der Schnitte mit Liquid Blocker reduziert das einzusetzende Volumen. Anschließend wird 2 mal 5 Minuten mit 1xPBS gewaschen und für 10 Minuten mit Äquilibrationpuffer äquilibriert. Die Schnitte werden mit 50 µl terminaler Desoxynukleotidyltransferase (TUNEL-Reaktionsmischung) in 450 µl Markierungslösung (Nukleotid-Mischung) inkubiert. Dieser Schritt findet in einer Feuchtkammer bei 37°C für 60 min im Dunklen statt. Die Reaktion wird durch 15-minütige Inkubation mit 2x SSC-Lösung gestoppt. Anschließend wird dreimal für 5 min mit 1xPBS gewaschen. Die Zellkerne können im Anschluss mit DAPI gefärbt werden (siehe Gliederungspunkt 3.2.12). Nach einem weiteren Waschschrte mit 1xPBS und Spülen mit dest. H₂O, werden die Schnitte getrocknet und mit Kaiser's Glyceringelatine gedeckelt.

3.2.15 Karnovsky-Roots-Färbung

Mit dieser Färbemethode von Karnovsky & Roots (206) kann die Aktivität der AChE sichtbar gemacht werden. Bei dieser Färbung handelt es sich um eine chemische Reaktion zwischen dem Enzym Acetylcholinesterase (AChE) in den fixierten Präparaten und Acetylthiocholinjodid. Die chemische Reaktion beruht auf zwei aufeinander folgenden Schritten. Im ersten Schritt wird Acetylthiocholinjodid von AChE als Substrat zu Acetat und Thiocholin umgesetzt. Die Sulphydrylgruppen (-SH) des Thiocholins reduzieren in der Färbelösung das

Eisen (III) in dem Hexacyanoferration zu Eisen (II) und werden dabei selbst oxidiert. Im zweiten Schritt reagiert das Hexacyanoferrat (II) mit Kupferionen aus dem zugesetzten Kupfersulfat zu Kupfercyanoferrat (II). Das Kupfercyanoferrat (II) bildet einen braunen Niederschlag (*Hatchett-braun*) (207-208). Der chemische Vorgang ist in Abbildung 12 dargestellt. Diese Reaktion funktioniert sowohl bei der AChE als auch bei der Butyrylcholinesterase (BChE). Es ist daher erforderlich, eine Inhibition für eine der beiden Cholinesterasen zu verwenden. In dieser Arbeit beschränke ich mich auf die AchE-Aktivität und verwende daher IsoOmpa (10^{-2}M) zur Blockierung der BChE.

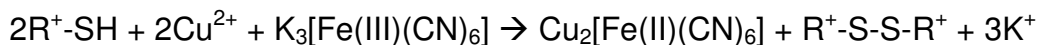
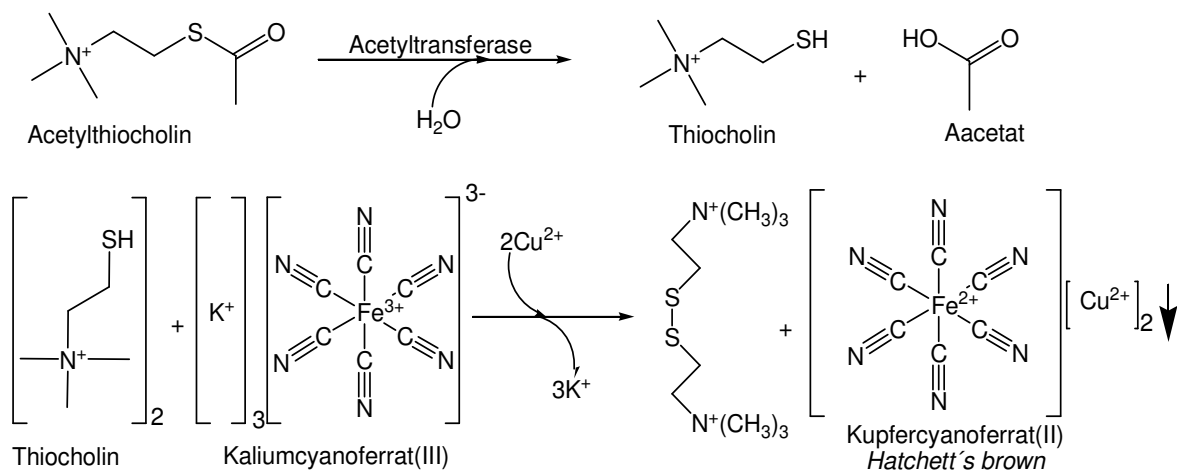


Abbildung 12. Reaktionsabfolge der Karnovsky-Rosenthal-Färbung. Das Acetylthiocholin wird durch die enzymatische Aktivität der Esterasen hydrolysiert. Die reaktive Sulphydrylgruppen (-SH) reduziert die Eisen (III) Verbindung zu Eisen (II). Dieses reagiert mit zugefügten Cu^{2+} -Ionen und fällt als brauner Niederschlag (Hatchett's brown) aus.

Für die Karnovsky-Rosenthal-Färbung werden getrocknete Schnitte in Tris-Maleat-Puffer für 10 min äquilibriert. Daraufhin wird der Äquilibrierungspuffer verworfen und die Färbelösung hinzugegeben. Die Färbelösung setzt sich wie in Tabelle 4 beschrieben zusammen. Bei der Herstellung dieser Lösung ist auf die genaue Reihenfolge und die tropfenweise Zugabe von CuSO_4 und $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, sowie auf eine frische Herstellung zu achten. Die Schnitte mit der Färbelösung werden bei 37°C inkubiert, bis eine deutliche Braunfärbung durch Kupfersulfid (CuS) entstanden ist.

Substanz	Mengen	
Tris-Maleat-Puffer	32,5 ml	
0,1M $C_6H_5Na_3O_7$	2,5 ml	
30mM $CuSO_4$	5 ml	tropfenweise
5M $K_3[Fe(CN)_6]$	5 ml	tropfenweise
H_2O	5 ml	
Acetylthiocholinjodid	36 mg	
10^{-2} M iso ompa	500 μ l	

Tabelle 4 Zusammensetzung der Färbelösung nach Karnovsky & Roots

Die Reaktion wird durch einfaches Waschen der Schnitte mit H_2O gestoppt. Anschließend kann eine Zellkernfärbung mit DAPI folgen, wie sie unter Gliederungspunkt 3.2.12 beschrieben wurde. Bevor die Schnitte mit Kaiser's Glycingelatine eingedeckt werden können, erfolgt ein Waschschrift mit H_2O dest. und die Trocknung bei 37 °C.

3.2.16 Statistische Analyse von mikroskopisch erfaßten Bildern mit ImageJ

Immunfärbungen werden mit dem Axiophot Fluoreszenzmikroskop ausgewertet und mit Hilfe der angeschlossenen Digitalkamera Axiocam dokumentiert. Die Bildbearbeitung und Speicherung erfolgt mit der Software Axiophot. Zur Bestimmung einer mengenmäßigen Ungleichverteilung oder Intensität von gefärbten Zellen, ist eine statistische Auswertung nötig. Eine statistische Auswertung von Fluoreszenzbildern erfolgt mit dem *freeware* Programm ImageJ. Dieses Programm erleichtert die Erfassung gewünschter Analysen, indem eine Zellzählung entfällt. In dieser Arbeit wird ImageJ für die statistische Auswertung von Sphäroidflächen und Fluoreszenzfärbevergleichen verwendet. Die Vorgehensweisen in den einzelnen Bereichen wird im Folgenden erläutern.

3.2.16.1 Statistischer Vergleich von Fluoreszenzfärbungen

Diese Methode basiert auf einem Verhältnis von positiven Pixeln aus der Immunfärbung zur untersuchten Gesamtfläche. Zu diesem Zweck werden 10 –20

Bilder von verschiedenen Schnitten einer Probe mit den gleichen Konditionen wie z.B. der Belichtungszeit und Kontrast aufgenommen. ImageJ ermöglicht die Analyse vieler Funktionen. Zur einfachen Analyse der positiven Areale in Kontrolle und Behandlung, wird ein in ImageJ für alle Bilder gültiger Schwellenwert (*Threshold*) gewählt und mit der *apply*-Funktion auf alle Bilder übertragen, wodurch ein binäres Bild entsteht. Die nun positiven Pixel entsprechen der positiven Färbung. Mit der Funktion *Region of Interest* (ROI) - ROI-Manager können die positiven Pixel in Kontrolle und Behandlung statistisch gegenübergestellt werden. Die verwendeten Bilder zeigen Gewebe und den dazwischen liegenden leeren Raum. Für die Statistik ist es zwingend notwendig, dass die DAPI-Fläche miteinbezogen wird. Hierzu werden die Daten von der DAPI⁺-Fläche mit den Daten der Immunfärbung ins Verhältnis gesetzt. Die daraus resultierenden Werte beziehen sich nur auf Areale mit Gewebe.

Zur Analyse von bestimmten Bereichen (z.B. in Explantatquerschnitten), wurden mit der *freehand selection* Bereiche in jedem Bild festgelegt und im ROI-Manager gespeichert. Diese festgelegten Bereiche lassen sich von den DAPI-Bildern auf die Immunfärbungen übertragen. So ist es möglich, unter Berücksichtigung der DAPI⁺-Fläche bestimmte Areale zu analysieren.

3.2.16.2 Statistische Messung von Sphäroidflächen

Diese Methode ist eine simple Form der Auswertung, wie es in Gliederungspunkt 3.2.16.1 beschrieben wurde. Hier ist es möglich, lebende Sphäroide zu fotografieren und für die statistische Auswertung zu verwenden. Für eine problemlose Auswertung wurde darauf geachtet, dass die Sphäroide nicht aneinander liegen, da es später in der Auswertung als ein Sphäroid gelten würde. Mit einem Zusatztool ist es möglich, diese Sphäroide als zwei separate Flächen zu werten. Allerdings werden die Sphäroide durch eine gerade Linie getrennt und das würde das Ergebnis bei häufigem Auftreten verfälschen. Auf diese Bilder wurde ein *Threshold* angelegt, der nur die Fläche der Sphäroide als positiv anerkennt. Bei der Auswertung können verschiedene Parameter berücksichtigt werden. Hierzu gehört, dass Sphäroide, die vom Bildrand angeschnitten sind, nicht gewertet werden oder dass kleine Partikel (tote Zellbrocken), die kein Sphäroid darstellen, ausgeschlossen werden. Alle genannten Einstellungen lassen sich

unter dem Menüpunkt *analyze Particles* inklusive der Erstellung der Daten vornehmen. Die Daten wurden in Excel gemittelt und gegenübergestellt.

3.2.16.3 Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben

Für die statistische Analyse und das graphische Design wurde die Analyse-Software GraphPad Prism (Version 3.02) verwendet. Die gesammelten Daten aus dem Katalase-Test, wurde dem Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben unterzogen. Für die Anwendung des t-Tests ist die Normalverteilung der Werte einer Stichprobe Voraussetzung. Für die Erstellung einer Wertegruppe, wurden mindestens 6 unabhängige Kulturansätze verwendet. So entspricht einem einzelnen Wert im Graphen eine statistische Auswertung, welche auf 6 separaten Versuchsdurchgängen basiert.

3.2.17 Molekularbiologische Methoden

3.2.17.1 Ernten von Rosettensphäroiden für RNA-Isolierung

Für die Isolierung der Gesamt-mRNA werden entsprechende Proben aus Monolayern, Sphäroid-Kulturen und Explantat-Kulturen in 1,5 ml Tubs gesammelt. Für Monolayerproben werden die Zellen, wie bei einer Passage (Gliederungspunkt 3.2.8) vom Kulturboden gelöst und in einem 15 ml Zentrifugenrohr gesammelt. Diese Proben werden bei 1000 rpm für 10 min pelletiert und in einem kleinen Volumen in ein 1,5 ml Tube überführt. Die gesammelten Proben aus Monolayer-, Sphäroid- und Explantat-Kulturen werden zweimal mit sterilem PBS gewaschen (für Monolayer: jedes Mal für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert). Zuletzt wird der Überstand abgesaugt und das Material bei –80 °C gelagert.

3.2.17.2 Isolierung der Gesamt RNA

Zur Isolierung der mRNA für molekularbiologische Untersuchungen wird das *Masterpure Complete DNA and RNA Isolation Kit* von Epicentra Biotechnologies verwendet. Die Isolierung der mRNA und die Beseitigung von Zellmaterial beruht bei dieser Methode auf dem Ausfällen der jeweiligen Komponente. Die Löslichkeit der Proteine wird durch Zugabe von Salzen soweit eingeschränkt, dass diese ausfallen. RNA bzw. DNA wird mit Alkohol ausgefällt.

Proben für die molekularbiologischen Untersuchungen werden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Entsprechende Proben werden auf Eis aufgetaut und mit 150 μl Lyse-Lsg. versetzt. Anschließend folgt der Zellaufschluss durch Ultraschall-Behandlung (1x 30 sek.). Nach der Sonifizierung der Proben werden weiter 150 μl Lyse-Lsg. zugefügt und gründlich gemischt. In dieser zweiten Lyse-Lsg. sind 1 μl Proteinase K (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) enthalten. Der Ansatz wird für 15 min bei 65°C in einem 1,5 ml Tube im Heizblock inkubiert und alle 5 min gründlich geschüttelt. Zum Stoppen der Proteinase K Reaktion, werden die Proben für 5 min auf Eis gelagert. Anschließend werden 150 μl *MPC Protein Precipitation Reagent* zugefügt und gründlich geschüttelt. Die Lösung enthält hohe Salzkonzentrationen, durch die Proteine und Zelltrümmer ausfallen. Durch Zentrifugation (14000 rpm; 4°C ; 10 min) lassen sich die Proteinbestandteile von der Nukleinsäure abtrennen, indem der Überstand in ein neues 1,5 ml Tube überführt wird. Zu diesem Überstand wird 500 μl 100%iges Isopropanol zugefügt, um alle Nukleinsäuren auszufällen. Der Ansatz wird 30-40 mal vorsichtig invertiert. Durch zentrifugieren (14000 rpm; 4°C ; 10 min) pelletiert die Nukleinsäure und kann von der restlichen Lösung getrennt werden. Das Pellet besteht aus der gewünschten mRNA und genomischer DNA. Zur Beseitigung der DNA wird ein DNase Verdau durchgeführt. Das Nukleinsäurepellet wird in 200 μl DNase Lsg. (195 μl DNase Puffer + 5 μl RNase freie DNase; 1 U/ μl) gelöst. Der DNA Verdau wird bei 37°C für 30 min inkubiert. Der DNase Verdau wird durch die Zugabe von 200 μl *2x T and C Lysis Solution* und anschließendes vortexen gestoppt. Die DNase wird durch eine weitere Proteinfällung von der Nukleinsäure getrennt. Hierzu wird 200 μl „MPC Protein Precipitation Reagent“ zugegeben und gründlich geschüttelt. Nach einer 5 min Inkubation auf Eis werden die Proben zentrifugiert (14000 rpm; 4°C ; 10 min). Der Überstand wird anschließend in ein neues 1,5ml Tube überführt. Dieser Schritt muss eventuell wiederholt werden, wenn das Proteinpellet nicht fest genug war. Im Überstand befinden sich mRNA- und DNA-Trümmer, die durch die DNase in kleine nicht störende Fragmente geschnitten werden. Zur Aufkonzentrierung der RNA wird diese durch Zugabe von 500 μl 100%igem Isopropanol ausgefällt. Der Ansatz wird wie zuvor 30-40 mal invertiert und zentrifugiert (14000 rpm.; 4°C ; 10 min). Der Überstand wird verworfen und

das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nachdem das Ethanol vollständig abgedampft ist, wird das Pellet in 10-50 µl TE-Puffer aufgenommen.

3.2.17.3 Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA

Die gelöste Gesamt-RNA wird am NanoDrop-Spektrometer gemessen. Hierzu wird 1 µl über die optische Dichte (OD) bei 260nm quantifiziert. Die Quantifizierung wird unter der Annahme durchgeführt, dass eine Absorption von eins der Menge von 40g/l Einzelstrang-RNA (ssRNA) entspricht. Eine Verdünnung der Probe ist erforderlich, sobald die Absorption den linearen Messbereich des Gerätes (OD 0,1-1) überschreitet. Als Referenzwert wird das Lösungsmittel TE-Puffer eingesetzt. Parallel wird die Verunreinigung mit Proteinen über die OD bei 280nm bestimmt. Das Verhältnis der OD-Werte bei einer Wellenlänge von 260nm zu 280nm beschreibt die Reinheit der RNA. Dieser Wert sollte zwischen 1,7 und 2,1 liegen. Die gelöste Gesamt-RNA wurde bei -80 °C gelagert.

3.2.17.4 cDNA-Synthese

Ausgehend von der unter Gliederungspunkt 3.2.17.2 und 3.2.17.3 isolierten RNA wird mit Hilfe der reversen Transkription cDNA erzeugt. Für die cDNA-Synthese wird das *RevertAid First Strand cDNA-Synthesis Kit* von Fermentas verwendet. Durch die Verwendung von Oligi (dT)₁₈ Primer werden ausschließlich mRNA als Matrize zur cDNA-Synthese verwendet. Für die RT-PCR wird eine RNA-Konzentration von 2 µg in maximal 11 µl benötigt. Die Proben werden entsprechend mit DEPC H₂O, unter Verwendung der unter Gliederungspunkt 3.2.17.3 bestimmten RNA-Konzentration, verdünnt. Die Zusammensetzung einer RT-Reaktion setzt sich wie folgt zusammen (Tabelle 5):

Dieser Reaktionsansatz wird zu jeder Probe zugegeben und gründlich geschüttelt. Das Endvolumen beträgt 20 µl. Um Blasen zu entfernen, wird anschließend kurz mit Hilfe einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Im Thermocycler wird der Ansatz für 60 min bei 42 °C, der Optimaltemperatur der Reversen Transkriptase, erwärmt. Anschließend erfolgt eine Hitzedeaktivierung des Enzyms bei 70 °C. Nach 5 min wird der Ansatz auf 4 °C abgekühlt und kann im Anschluss bei -20 °C gelagert werden.

Substanz	Volumen
Reaktionspuffer 5x	4 μ l
Oligo (dT)18 Primer (100 μ M)	1 μ l
dNTP Mix (10 mM)	1 μ l
RiboLock RNase Inhibitor (40 u/ μ l)	2 μ l
RevertAid (200 u/ μ l)	1 μ l
Gesamtvolumen:	9 μ l

Tabelle 5 Pipettierschema für cDNA-Synthese (RT-PCR)

3.2.17.5 PCR-Amplifikation

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist eine simple Methode, bestimmte DNA-Abschnitte zu amplifizieren, um sie in andere Organismen oder Plasmide einzubauen. In dieser Arbeit wird die PCR lediglich zum Nachweis bestimmter Genexpressionen verwendet. Diese Methode denaturiert im ersten Schritt die DNA bei 95°C. Spezifische Oligonukleotid-Primer lagern sich an den passenden komplementären Sequenzen an die cDNA an, sobald die Temperatur auf 70- 50°C gesunken ist. Die *annealing* Temperatur sowie die Dauer für das *annealing* und die Anzahl der Zyklen, richten sich nach Länge und GC-Gehalt der jeweiligen

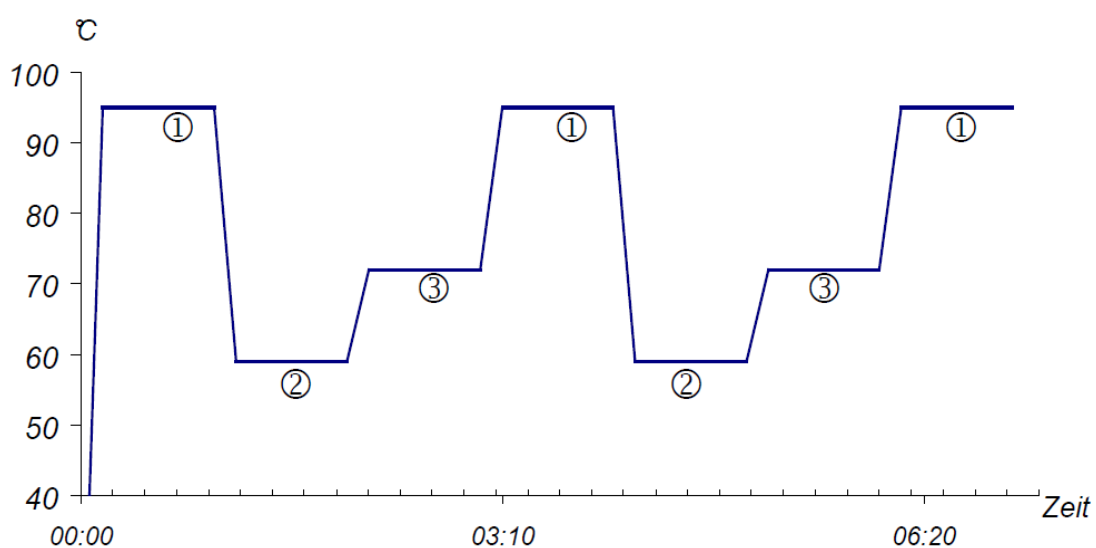


Abbildung 13. Schematische Darstellung eines typischen PCR-Programmes. Die unterschiedlichen Temperaturen des Programmes sind in Abhängigkeit zur Zeit dargestellt. Hierbei durchläuft das Programm die Phasen der ①: Denaturieren; ②: Annealing; ③: Elongation.

spezifischen Primer. Der einzelsträngige DNA-Strang wird durch die DNA abhängige DNA-Polymerase bei 72°C Arbeitstemperatur vervollständigt. Nach der sogenannten *elongation* der DNA ist ein Zyklus vollendet. In Abbildung 13 ist ein typischer Verlauf eines Zyklus in Abhängigkeit von Zeit und Temperatur dargestellt.

Für einen PCR-Ansatz wird 2 µl cDNA aus Gliederungspunkt 3.2.17.4 verwendet. Desweiteren benötigt die PCR die Bausteine der DNA (dNTP), spezifische *sence* und *antisence* Primer vom *gen of interest*, eine Polymerase für die Doppelstrangproduktion und Puffer. Das TopTaq-PCR Kit von Qiagen enthält alle Komponenten der PCR mit Ausnahme von cDNA und Primer. Der PCR-Ansatz setzt sich wie folgt zusammen (Tabelle 6).

10x Puffer	3 µl
Q-Solution	6 µl
CoralLoad	3 µl
dNTPs (10 µM)	1 µl
Primer forward (10 µM)	1,5 µl
Primer reverse (10 µM)	1,5 µl
DEPC- Wasser	11,8 µl
TopTaq DNA-Polymerase (5 u/µl)	0,2 µl
cDNA	2 µl
<hr/>	
Gesamtvolumen:	30 µl
<hr/>	

Tabelle 6 PCR-Pipettierschema pro Ansatz

Nach kurzem Vortexen und Abzentrifugieren werden die Ansätze in den Block des Thermocyclers gestellt. Zur Sicherstellung, dass keine Kontamination eine der PCR-Komponente befallen hat, wird jedes Mal eine Negativkontrolle mitgeführt, die alle Komponenten der PCR enthält, mit Ausnahme der Template-cDNA. Details zu den in dieser Arbeit verwendeten Primer sind unter Gliederungspunkt 3.1.7 zusammengefasst. Nachdem die PCR den letzten Zyklus vollendet hat, erfolgt eine 10 min Extension zur Vervollständigung sämtlicher Amplifikationen. Dieser Schritt trägt maßgeblich zur Bildung scharf abgegrenzter Banden im Gel bei.

Die Auftrennung des PCR-Produkts erfolgt auf einem ethidiumbromidhaltigen 1,2%igen Agarose-Gel. Hierfür wird die entsprechende Menge Agarose mit TAE-Puffer in der Mikrowelle solange aufgeköcht, bis die Agarosereste vollständig in Lösung gegangen sind. Die Lösung wird anschließend auf ca. 45°C unter ständigem Schwenken abgekühlt. Ist die gewünschte Temperatur erreicht, wird die entsprechende Menge Ethidiumbromid zur Agaroselösung zugefügt und nach kurzem Schwenken in die Gelgußform überführt. Ethidiumbromid wird 1:40000 mit der aufgeköchten Agaroselösung verdünnt. Es ist darauf zu achten, dass sich keine Blasen im Gel bilden, die einen gradlinigen Verlauf der Auftrennung stören. Das polymerisierte Agarosegel wird mit TAE-Puffer überschichtet und der Kamm entfernt, der im Gel Aussparungen erzeugt hatte zur späteren Probenbeschickung des Gels. Die Proben werden in die Geltaschen pipettiert und bei 80 V für ca. 45 min aufgetrennt. Ethidiumbromid interkaliert in der DNA, sodass nach der Auftrennung die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert werden können. Die Fragmentgröße des PCR-Produktes im Gel wird mit einem DNA-Standard (100bp Marker) bestimmt.

3.2.17.6 Auswertung vor Agarosegelen mit ImageJ

Für die Gelauswertung besitzt ImageJ ein integriertes *tool*. Mit dem Hilfsmittel *Rectangular Selection* werden die entsprechenden Banden umrandet. Hierzu ist es notwendig, dass die Banden einigermaßen horizontal auf dem Bild angeordnet sind. Über die Funktion *select first lane* wird der zu analysierende Bereich festgelegt. Über den Menüpunkt *plot lanes* wird eine Kurve generiert. Die Fläche unter der Kurve gibt die Menge der Gelbanden-Pixel im Verlauf des Areals (*lane*) wieder. Im Idealfall berührt die Kurve zwischen zwei Gelbanden den Bildrand. Mit dem *tool straight line selection* wird die Basislinie durch das Verbinden der Minima eingezeichnet. Das Hilfsmittel *Wand (tracing)* vermisst die Flächen der *Peaks*. Die Messart kann unter *Set Measurements* vorher bestimmt werden. Um Pipettier- Ungenauigkeiten zu kompensieren, wird die GAPDH-Expression auf die gleiche Weise vermessen. Die ermittelten Werte der Proben und der GAPDH-Expression werden in einer Excel-Tabelle ins Verhältnis gesetzt. Da die Expressionsstärke der einzelnen Gene nicht von Interesse sind, wurde in den meisten Fällen die Werte der Kontrolle als 100% gewertet, um die Reaktion auf verschiedene Behandlungen

miteinander vergleichen zu können. Somit wird in diesen Statistiken die Expressionsstärke der unterschiedlichen Gene vernachlässigt.

3.2.18 Katalase-Test

Der Katalase-Test wird nach Aebi und Cohen (209-210) durchgeführt. Hierzu muss der auf Monolayer basierende Test auf das Sphäroid-Kultursystem angepasst werden. Für den Test werden Sphäroid-Kulturen angelegt, wie unter Gliederungspunkt 3.2.4 beschrieben und zum bestimmten Zeitpunkt geerntet. Die Sphäroide werden hierzu in einem 1,5 ml Tube gesammelt und drei mal mit sterilem PBS gewaschen. Zuletzt wird der Überstand abgenommen. Proben, die nicht sofort für den Test bestimmt sind, werden bei -80°C gelagert. Bei jeder Behandlung mit AAA oder Ascorbat wird eine nichtbehandelte Kontrolle mitgeführt. Probe die für den Test bei -80°C gelagert worden sein, werden auf Eis aufgetaut und mit 100 μl kaltem Phosphatpuffer 50 mM versetzt. Zum Homogenisieren wird die Probe mittels Ultraschall 30 sek homogenisiert. Anschließend wird die Probe mit kalter 0,1% Triton X-100 versetzt, sanft gemixt und auf Eis gelagert. Die 0,1%ige Triton-Lsg. steigert sowohl die Membranpermeabilität, als auch eine effiziente Isolierung cytoplasmatischer Komponenten, wie der Katalase. Es ist allerdings darauf zu achten, dass die Konzentration von Triton in der Probe unter 0,001% liegt, da Triton eine Absorption bei 240nm aufweist.

Nicht verwendetes Homogenisat wird bei -80°C gelagert. Die Zelltrümmer werden durch Zentrifugation bei 14000 rpm, 15 min (max. Geschwindigkeit) und 4°C abgetrennt. Der Überstand wird in ein neues Tube überführt und das Pellet verworfen. Der Probenüberstand wird 1:50 mit kaltem Phosphatpuffer 50 mM verdünnt. Es ist besonders wichtig, dass der Test innerhalb von 10 min durchgemessen wird. Die Katalase besitzt einen aktiven und einen inaktiven Zustand. Durch das Verdünnen sinkt der Anteil an aktiver Katalase innerhalb kurzer Zeit (210). Zur Bestimmung der Katalase-Aktivität wird nun 20 μl verdünnte Probe eingesetzt und eine frisch verdünnte 0,3%igen H_2O_2 -Lsg. zugegeben. Die Zusammensetzung von Probe und *blank* sind für ein Gesamtvolumen von 200 μl in Tabelle 7 zusammengefasst. Die Probe wird bei 240nm spektrophotometrisch (BioMate TM 3) gemessen. In Intervalllängen von 10 sek, über einen Zeitraum von 1 Minute, wird die Absorption gemessen.

Ansatz	Blank
20 µl Probe (1:50)	20 µl Probe
20 µl H ₂ O ₂ (1:100)	
160 µl Phosphatpuffer	180 µl Phosphatpuffer
<hr/>	
200 µl Endvolumen	200 µl Endvolumen

Tabelle 7 Katalase-Test Pipettierschema für *blank* und Probe.

Als Probenmaterial werden Sphäroide oder Explantate mit einer unbestimmbaren Zellanzahl verwendet. Damit die einzelnen Proben ins Verhältnis gesetzt werden können, muss eine quantitative Messung in der späteren Berechnung der Katalase-Units mit einfließen. Zur diesem Zweck wird zu jeder Probe die Protein-Konzentration bestimmt. Als Messlösung wird derselbe Überstand verwendet, der auch bei der spektrophotometrischen Messung verwendet wurde. Durchgeführt wird die Konzentrationsbestimmung am Nanodrop ND-1000 Spectrophometer peqlab Biotechnologie GmbH (Software: ND-1000 V3.7.1). Als *blank* wird Phosphatpuffer 50mM und die entsprechende Triton-Konzentration von 0,1% eingesetzt.

Für die Positivkontrolle werden, wie in 3.2.4 beschrieben, Rosettensphäroid-Kulturen angesetzt. Als Stressfaktor werden einige dieser Kulturen mit 0,5 mM H₂O₂ für 18 h behandelt. Die Sphäroide werden, wie vorher, geerntet und bei -80 °C gelagert. Der Test wird in gleicher Weise durchgeführt.

Die Absorptionswerte der Katalase-Aktivität werden gegen die Zeit aufgetragen und eine Regressionsgerade erstellt. Anhand der Geradengleichung werden nun 2 Absorptionswerte für die Regressionsgerade bestimmt. Mit den zwei Absorptionswerten kann mit Hilfe der unten aufgeführten Formel die Geschwindigkeitskonstante k (Umsatz/Zeit) der Reaktion ermittelt werden:

$$k = \left(\frac{1}{\Delta t} \right) \ln \left(\frac{A1}{A2} \right)$$

k = Geschwindigkeitskonstante

Δt = Zeitraum zwischen t_1 und t_2

$A1$ = Absorption zu t_1

$A2$ = Absorption zu t_2

k entspricht dem Ansatz von 200 μl und muss auf 1 ml normiert werden. Zur Vergleichbarkeit der einzelnen Proben werden die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten (k) zu den jeweiligen Protein-Konzentrationen ins Verhältnis gesetzt.

$$\text{EnzymUnits} = \frac{k}{\text{Proteinkonzentration}} [\text{mg/ml}]$$

Die Katalase-Units werden wie folgt definiert: 1 Unit (U) ist die Menge an Enzym, die 1 μmol Substrat (H_2O_2) in 1 min umsetzt. Die Units müssen in Bezug zu der Substrat-Konzentration (H_2O_2) gesetzt werden.

3.2.19 Sterilisation von Medien und Glaswaren

Für die Kultivierung und das Arbeiten mit Nukleinsäuren, insbesondere mit RNA, ist es unerlässlich, dass die verwendeten Medien, Puffer und Glaswaren sterilisiert werden. Die Sterilisation der Medien und Puffer erfolgt durch das Autoklavieren bei 120°C und 2 bar für 20 min., bzw. kleinere flüssige Volumina werden sterilfiltriert. Glaswaren werden für 5 h bei 180°C im Trockenschrank inkubiert.

4 Ergebnisse

4.1 Zellkultursysteme

4.1.1 Reifung von Müllerzellen und Photorezeptoren im Explantatsystem

Für diese Arbeit wurde ein Retina-Explantatsystem etabliert und optimiert, das ohne weitere Zusätze im Vollmedium alle Strukturen der *in vivo*-Retina (IPL, OPL, Subbanden in der IPL etc.) ausbildet. In der Diplomarbeit von Julia Wiedemann wurde dieses System verwendet. Sie zeigte, dass die Ganglienzellen innerhalb von 4 Tagen *in vitro* vollständig abgestorben waren. Dennoch entwickeln sich alle retinalen Strukturen, insbesondere der IPL. Um den Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Reifung der Müllerzellen besser deuten zu können, wird im Folgenden zunächst die generelle Müllerzell-Entwicklung in der *in vivo*-Retina mit der Explantat-Entwicklung verglichen. Abbildung 14 zeigt Kryoschnitte von *in vivo*-Retina (E13-E17) und Explantaten (Tag 2 und 4) zu verschiedenen Stadien, welche immunhistochemisch gegen Müllerzellen (Glutaminsynthetase; GS) und Stäbchen-Photorezeptoren (CERN 901) gefärbt wurden. Innerhalb der gezeigten Stadien erreichen die ersten Müllerzellen einen höheren Reifegrad und exprimieren GS. GS ist ein etablierter Marker, der in der Retina nur von Müllerzellen exprimiert wird. *In vivo* beginnt die GS-Expression ab Hamburger Hamilton-Stadium E14 (204). In diesem Stadium war die GS-Expression nur um den Müllerzellkern herum lokalisiert, wie es in der vergrößerten Ansicht in Abbildung 14 zu erkennen ist. Die GS-Expression setzte sich im weiteren Entwicklungsverlauf in die basalen Zellfortsätze fort (besonders in den basalen Endfüßen; ILM) und breitet sich bis E17 in der gesamten Müllerzelle aus. Im Explantat entwickelt sich die GS-Expression wesentlich schneller. Bereits nach 2 Tagen *in vitro* beginnt die GS-Expression und war ab dem 4. Tag *in vitro* voll ausgebildet. Dabei ist zu bedenken, dass die Explantate zum Stadium E6 präpariert wurden und dass Tag 2 *in vitro* etwa E8 *in vivo* bedeutet. Wäre die GS gleich der *in vivo*-Retina entwickelt, so würde GS erst am Tag 8 im Explantat exprimiert. Somit ist die GS-Expression um 6 Tage beschleunigt. Auch die Expression von Rhodopsin in Stäbchen-Photorezeptoren wurde *in vitro*

beschleunigt. Die Rhodopsin-Expression in Stäbchen begann ab E16 *in vivo*. Zu diesem Stadium war Rhodopsin in der gesamten Zelle verteilt. Ab E17 waren die ersten der Segmente der Photorezeptoren deutlich zu sehen (Abb. 14 d, Kreise).

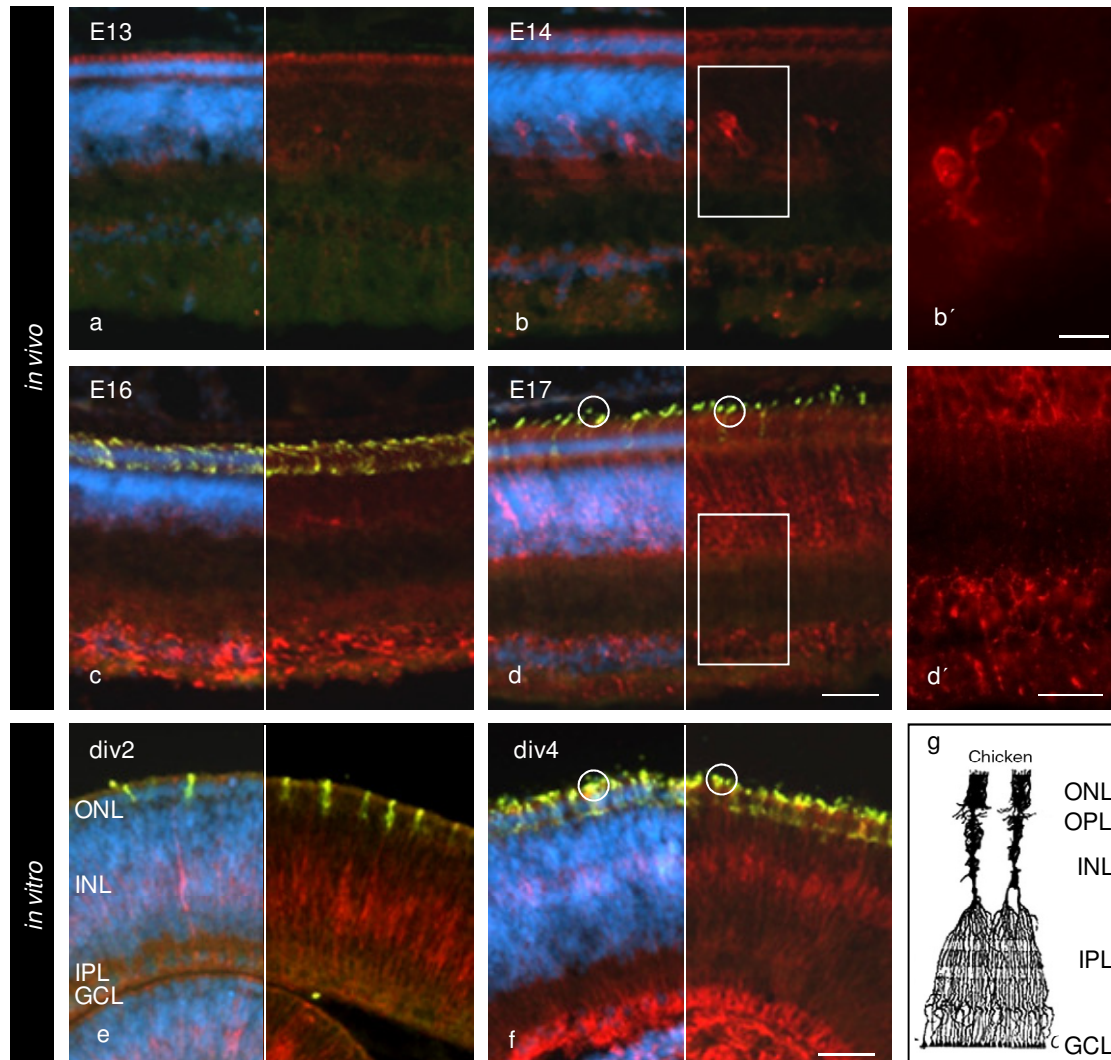


Abbildung 14 Müllerzellentwicklung *in vivo* und *in vitro* im Vergleich. Verschiedene *in vivo* (a-d) und *in vitro* (e-f) Retina-Kryoschnitte wurden immunhistochemisch gegen Müllerzellen (GS; rot) und Stäbchen (CERN 901; grün) gefärbt. Beachte, dass div2 E8 entspricht und, dass die GS- und Rhodopsin-Expression schon 6 bzw. 8 Tage früher im Explantat einsetzt als *in vivo*. Die Kreise in d und f markieren die Segmente der Stäbchen. Die Bilder b' und d' sind beispielhafte vergrößerte Ansichten der GS-Färbung aus b und d. Das Bild g zeigt eine schematische Darstellung einer Hühner-Müllerzelle (Cajal 1892). Kernfärbung DAPI in blau. Maßstab: 50 μ m.

Rhodopsin wird in die Segmente verlagert, sodass der Zellkörper Rhodopsin-frei erscheint. In Kultur war bereits am Tag 2 *in vitro* die ersten Stäbchen-Photorezeptoren Rhodopsin⁺. Die Verschiebung des Rhodopsins in die Segmente war auch am Tag 4 *in vitro* zu beobachten. Folglich ist auch die Entwicklung der Segmente der Photorezeptoren beschleunigt. Ein ähnliches Bild bot sich auch bei den Zapfen-Photorezeptoren (Daten nicht gezeigt). Die Zapfen entwickelten sich

in vivo etwas später als die Stäbchen-Photorezeptoren (E17). Im Explantatsystem war ebenfalls eine kleine Verzögerung der Zapfen-Entwicklung zu beobachten. Die IPL bildet sich ab Tag 2 *in vitro*, das entspricht in etwa der *in vivo*-Entwicklung. Die rasante Entwicklung der Müllerzellen und Photorezeptoren bedeutet natürlich ein Unterschied zur normalen *in vivo*-Entwicklung. Das Explantatsystem bot aber die Möglichkeit, innerhalb kurzer Zeit die frühe Entwicklung der hoch komplexen retinalen Strukturen *in vitro* zu studieren und wurde in dieser Arbeit neben dem etablierten Sphäroid-System als Haupt-Kultursystem eingesetzt.

4.1.2 Expressionsmuster relevanter Gene während der retinalen Entwicklung im Explantat

Nicht alle Gene, die im ausgewachsenen Organismus aktiv sind, müssen während der frühen Entwicklung zwangsläufig exprimiert werden. Um den Kreis der für diese Arbeit wichtigen Gene einzugrenzen, wurden folgende Gene mittels RT-PCR untersucht: GDNF, GFR α , BDNF, BDNF-Rezeptor (TrkB), PEDF, Glutaminsynthetase (GS), Vimentin, GFAP, Katalase, GLUT1 und SVCT2. Betrachtet werden die *in vivo* Stadien E6 – E14 und div1 – 8. Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse dieser Expressionsstudie. Der Rezeptor für PEDF ist bislang nicht identifiziert worden, somit kann in dieser Arbeit nur die Expression des Faktors PEDF selbst überprüft werden. Die meisten untersuchten Gene waren in den frühesten Stadien bzw. Kulturtagen exprimiert. Nur TrkB (der Rezeptor für BDNF), GFR α 1 (der Rezeptor für GDNF) und besonders PEDF wurden *in vivo* zu späteren Zeitpunkten exprimiert. Das Expressionsmuster *in vivo* spiegelt sich zumeist auch in den *in vitro*-Stadien wieder. Im Explantat wurde GFR α 1 schon 1 Tag früher exprimiert als in der *in vivo*-Retina (div1 entspricht E7). Auch TrkB wurde *in vitro* früher exprimiert. BDNF, GDNF und GFR α 4 zeigten vom ersten Tag *in vitro* bis Tag 4 einen leichten Anstieg der Genexpression, was *in vivo* nicht der Fall war. Die PEDF-Expression war *in vitro* auch spät exprimiert (Tag 6).

Neben den Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren wurden auch andere Gene betrachtet. GS ist ein Gen, das nur von Müllerzellen exprimiert wird. Eine GS-Expression wurde schon ab E6 *in vivo* gefunden, wobei eine GS-Immunfärbung erst ab E14 möglich ist. Da dies auch mit anderen Primer-Sequenzen beobachtet wurde, liegt die Vermutung nahe, dass die mRNA für GS in der Zelle vorliegt, sie

aber nicht in Protein umgesetzt wird. Dieses Phänomen war nicht auf die *in vivo*-Retina beschränkt, sondern auch in den *in vitro*-Proben zu beobachten. GFAP wurde unter Kulturbedingungen nur minimal exprimiert, während in der Retina *in vivo* von E10 bis E12 ein Anstieg der Expression zu erkennen ist. Katalase ist ein

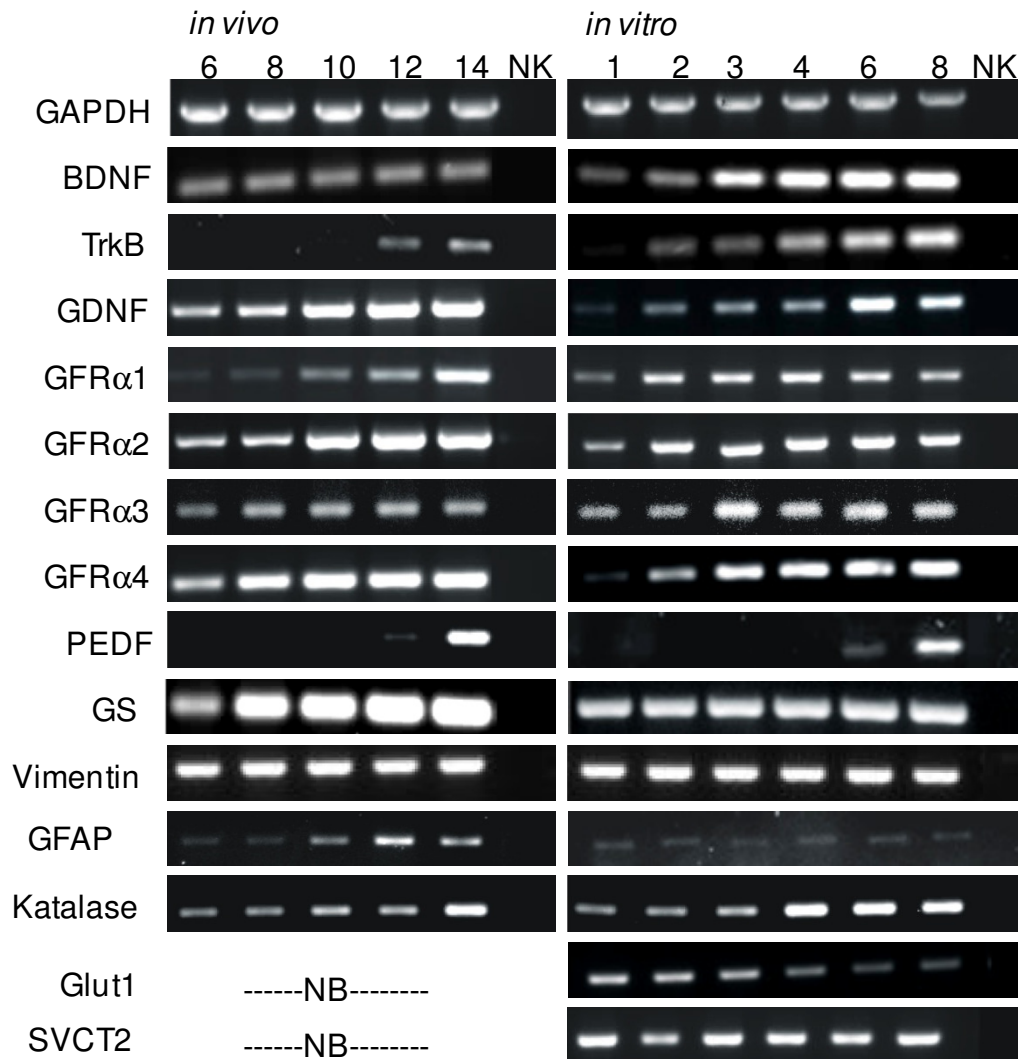


Abbildung 15. mRNA-Expression verschiedener Gene der Retina *in vivo* und *in vitro*. Betrachtet werden die *in vivo* Stadien E6, E8, E10, E12 und E14 sowie die *in vitro* Kulturtage 1, 2, 3, 4, 6 und 8. NK bezeichnet die Negativkontrolle NB: nicht bestimmt. Beachte, dass alle gezeigten Gene in der embryonalen Retina und im Explantat exprimiert werden.

Protein, das in nahezu allen Zellen exprimiert wird. Neben Glutathion (GSH) schützt seine enzymatische Aktivität die Zellen durch Abbau von H_2O_2 vor oxidativem Stress und oxidiert H^+ -Donatoren (z.B. Methanol, Ethanol, Methansäure, Phenole, etc.) unter Verbrauch von H_2O_2 (40). Vimentin ist ein Marker für Müllerzellen, der in frühen Stadien in der gesamten Retina vorkommt, aber im Laufe der Entwicklung nur in Müllerzellen exprimiert wird (211). GLUT1

und SVCT2 sind Gene eines Transmembrantransporters für Hydroascorbat bzw. Ascorbat (212-215). Beide Gene wurden unter *in vitro*-Bedingungen exprimiert, was die Fähigkeit zum Dehydroascorbat- bzw. Ascorbat-Import zeigt. Diese Gene sind für die Wirkung von Ascorbat wichtig.

4.1.3 Erstellen von reinen Müllerzell-Populationen durch Ascorbat

Mehrfach wird berichtet, dass Radialgliazellen selbst nicht auf bestimmte zugesetzte Substanzen reagieren, aber ein Signal dennoch an andere Zellen weitergeleitet wird. Hierbei besitzen die Müllerzellen den Rezeptor für die entsprechenden Substanzen und stimulieren über Zell-Zell-Kontakte andere Zellen. Ein Beispiel ist GDNF und seine schützende Wirkung auf Photorezeptoren (182-183). Der direkte Rezeptor für GDNF ist GFR α 1, welcher in der Maus nicht in Photorezeptoren exprimiert ist, sondern nur in Ganglienzellen und vor allem in Müllerzellen (173, 216-217). Um die Fragen zu beantworten, ob Hühner-Müllerzellen als Ressource für BDNF, GDNF und PEDF dienen können und inwieweit Müllerzellen die Rezeptoren für BDNF und GDNF exprimieren (der Rezeptor für PEDF ist bislang nicht identifiziert), muss ein Weg gefunden werden, möglichst effizient reine Müllerzellen zu isolieren. Eine bisherige Methode reine Müllerzellen aus primären Geweben zu isolieren, benötigte im Idealfall mehr als 20 Tage (15). Das Ausgangsmaterial für diese herkömmliche Methode war retinales Gewebe vom embryonalen Tag 6. Wie für die Sphäroidpräparation geschehen, wurden dabei die Zellen vereinzelt und als Standkultur kultiviert. Durch horizontale Rotation wurden Neuronen, die an den Müllerzellen haften, abgeschüttelt. Mit der Zeit entstand so ein reiner Müllerzellrasen. Diese Müllerzellen waren allerdings wesentlich älter als die Müllerzellen im Explantat. Die Explantate wurden maximal bis Tag 10 *in vitro* kultiviert. Außerdem mussten die Müllerzellen zwischendurch passagiert werden, was zu einer unerwünschten spontanen Transdifferenzierung zu Neuronen führen konnte. Zudem waren die Müllerzellen am Ende der gesamten Prozedur kaum noch in der Lage zu proliferieren.

In einer Studie von Reis *et al.* (2001) (218) wird eine hohe Konzentration an Ascorbat (2 mM) verwendet, um reine Müllerzell-Monolayer zu erhalten. Dabei sterben alle Neuronen ab, während die Müllerzellen diese Behandlung

unbeschadet überleben. Eine mögliche Wirkungsweise von Ascorbat auf Neuronen wird in dieser Studie nicht beschrieben. Ascorbat ist das häufigste Antioxidanz im Blut und ist ein wichtiger wasserlöslicher Metabolit in den Zellen (219-221). Interessant ist, dass die meisten Säugetiere Ascorbat von Glukose in der Leber synthetisieren, aber diese Fähigkeit ging bei höheren Primaten (einschließlich des Menschen) und Meerschweinchen verloren. Somit benötigen diese ihr Ascorbat aus der Ernährung (222). Ascorbat ist in der Retina und im Hirngewebe im Vergleich zu anderen Organen (intrazelluläre Konzentration 1-2 mM) in hoher Konzentration vorhanden und es gibt einen mehr als 10-fachen Unterschied zwischen der Konzentration von Ascorbat in der Retina und im Gehirngewebe, verglichen mit der im Blut (223-226).

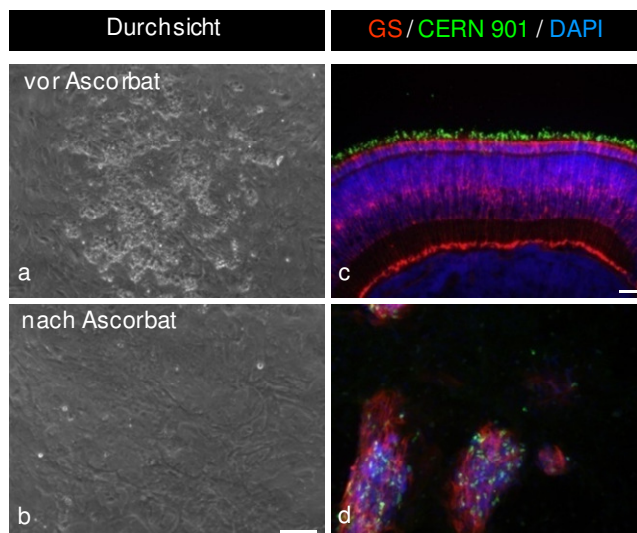


Abbildung 16. Müllerzellisolierung mit hohen Ascorbat-Konzentrationen. Die Bilder a und b zeigen einen Monolayer vor (a), und 24 h nach 2 mM Ascorbat (b). Die Fluoreszenzfärbungen gegen GS (rot) und CERN 901 (grün) zeigen einen div17-Explantat-Kryoschnitt (c) und einen mit Ascorbat behandelten Monolayer (d). Beachte, dass Ascorbat alle Neuronen beseitigt (b) und, dass in Abwesenheit von Neuronen die GS-Expression verschwindet (d). Maßstab: 50 μ m.

In Abbildung 16 ist der Effekt von 2 mM Ascorbat auf Monolayer-Kulturen dargestellt. Das Bild zeigt auf der linken Seite den Monolayer vor der Behandlung mit Ascorbat und dieselbe Region 24 h danach. Durch Ascorbat wurden alle Neuronen beseitigt. Auf der rechten Seite des Bildes (Abbildung 16 c, d) ist ein Monolayer und eine Färbekontrolle (div17, Explantat) gegen Müllerzellen (GS) und Photorezeptoren (CERN 901) gefärbt. Der Monolayer auf der rechten Bildseite stammt aus einer kürzeren Behandlung mit

Ascorbat, sodass nicht alle Neuronen absterben. In der GS-Immunfärbung ist ein interessantes Phänomen zu sehen: In Abwesenheit von Photorezeptoren exprimieren Müllerzellen keine GS. Sobald der direkte Zellkontakt zu den Photorezeptoren verloren gegangen ist, reduzieren die Müllerzellen die GS-

Expression. Hierbei wird angenommen, dass die Müllerzellen wieder einen Vorläuferstatus annehmen, d.h., sie dedifferenzieren sich (38, 57, 197, 227).

Um die Müllerzellen weiter zu charakterisieren, wurden Müllerzell-Monolayer gegen andere Müllerzell-Marker (Transitin und Vimentin) und neuronale Marker (Pax6 und Calretinin) gefärbt (Abbildung 17). Die Müllerzell-Marker Transitin und Vimentin färben Vorläufer von Müllerzellen. In gleicher Weise, wie in Abbildung 16, wurden entsprechende Färbekontrollen mitgeführt, in denen eine positive Immunfärbung erwartet wurde. Transitin ist ein Homolog von Nestin im Säugetier. Es ist zunächst in allen retinalen Vorläufern exprimiert und beschränkt sich später auf Müllerzellen (200). Vimentin wird bis Stadium E8 in der gesamten Retina exprimiert und beschränkt sich ab E10 auf Müllerzellen (211). Pax6 ist ein Marker für Amakrinzellen und Calretinin ist in Horizontalzellen, Ganglienzellen und Amakrinzellen exprimiert (118). Der Monolayer war sowohl Transitin⁺ als auch Vimentin⁺, dagegen negativ für Pax6 und Calretinin. Betrachtet man Charakterisierungen von Müllerzellen in der Literatur, werden solche Zellen, die zwar noch GS-negativ sind, als reine Müllerzellen bezeichnet (205, 228).

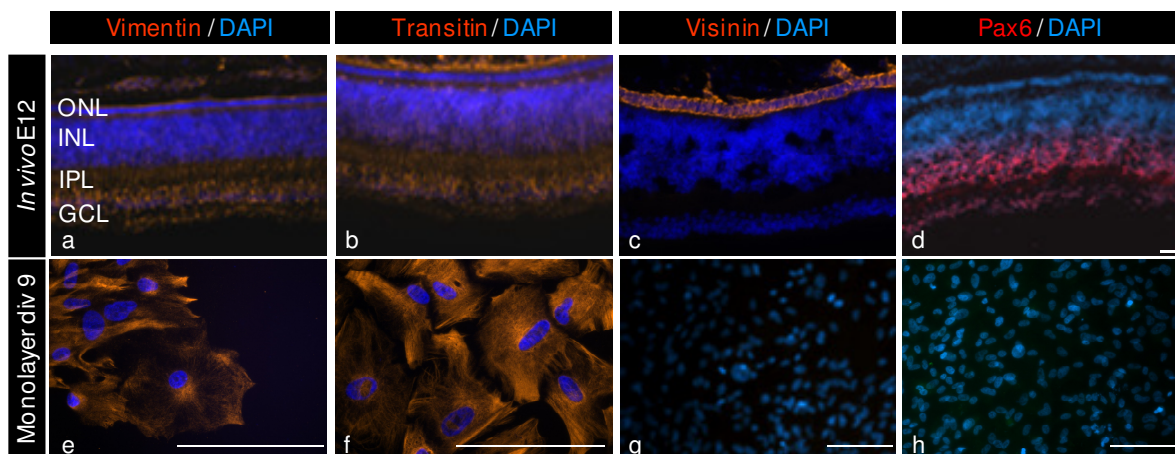


Abbildung 17. Neuronen-Reinheit der Müllerzell-Monolayer. Müllerzell-Monolayer (e-h) und Kontroll-Kryoschnitte aus E12 Retina (a-d) wurden gegen Müllerzell-spezifische (Vimentin und Transitin) und neuronale Marker (Visinin und Pax6) gefärbt. Die Zellen des Monolayers sind nur für Vimentin (e) und Transitin (f) anfärbbar. Kernfärbung DAPI in blau. Maßstab: 50 µm.

4.1.4 Stressinduktion durch Ascorbat im 3D-Kultursystem

Um Genauerer über den Ascorbat-induzierten Stress herauszufinden, wurden Sphäroide in gleicher Weise mit Ascorbat behandelt, wie bei der Erstellung der Müllerzell-Populationen. Die Sphäroide wurden mit 2 mM Ascorbat für 24h am Tag

8 *in vitro* behandelt. Die Sphäroide reagierten auf Ascorbat in ähnlicher Weise wie die Monolayer. Abbildung 18 zeigt, dass der Effekt nicht gleichmäßig auf den Sphäroid wirkt. In der 24-stündigen Ascorbat-Behandlung hatte sich ein „innerer Kernsphäroid“ und eine „äußere Region“ gebildet. Bei der mikroskopischen Untersuchung wurde deutlich, dass die inneren Zellen eine kompakte Struktur mit einer hohen Zelldichte bildeten. Der äußere Bereich wurde aus einer losen Anordnung von Zellen mit geringer Dichte gebildet, der sich bei stärkerem Schwenken ablöste. Zum Nachweis der selektiven toxischen Wirkung von Ascorbat auf Neuronen in Sphäroiden wurden Gefrierschnitte mit

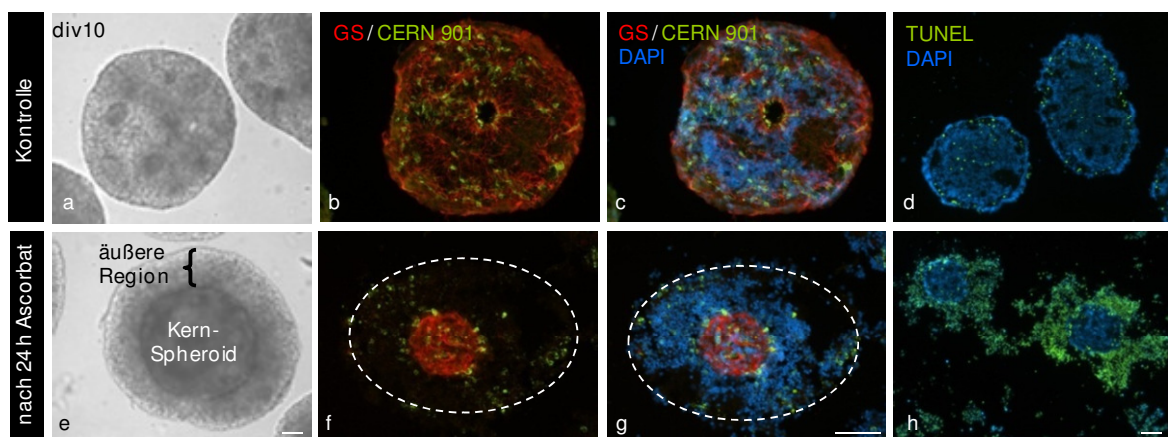


Abbildung 18. Neuronen sterben unter dem Einfluss von 2 mM Ascorbat, während Müllerzellen sich in einem Kern des Sphäroids zusammenziehen. Gezeigt sind div10 Sphäroide in Kultur (a und e) und gefärbte Kryoschnitte gegen Müllerzellen (GS; b-c, f-g; rot) und Photorezeptoren (CERN 901; b-c, f-g; grün) sowie gegen Apoptosen (TUNEL; d, h; grün). Im Vergleich zur Kontrolle (a-d) zeigen die mit Ascorbat behandelten Sphäroide (e-h) einen „inneren Kern-Sphäroid“ und einen äußeren Bereich (e). GS⁺-Zellen befinden sich im Kern-Sphäroid und Stäbchen in beiden Bereichen (f). Die Kernfärbung mit DAPI zeigt die Form des ursprünglichen Sphäroids (gestrichelter Kreis; f und g). Unter Einfluss von 2 mM Ascorbat sterben alle Neuronen im äußeren Bereich. Dieser Sachverhalt wird durch den TUNEL-Test bewiesen (d, i). Maßstab: 50 µm.

unterschiedlichen immunhistologischen Markern für Müllerzellen und Neuronen gefärbt. Bei der CERN 901-Färbung wurde deutlich, dass Photorezeptoren in der Kernregion und der äußeren Region vorhanden waren. Im Gegensatz dazu wurden Glutaminsynthetase⁺ (GS)-Zellen nur in Kernsphäroiden beobachtet. Die DAPI-Färbung zeigte, dass der äußere Bereich aus Zellen besteht, die teilweise CERN 901⁺ und Müllerzell negativ waren. Die gestrichelte Linie in Abbildung 18 f und g zeigt die ursprüngliche Größe des Sphäroides vor der Behandlung mit Ascorbat. In der TUNEL-Färbung zeigte sich, dass die Neuronen im äußeren Bereich durch 2 mM Ascorbat tatsächlich absterben. Die Anzahl TUNEL⁺-Zellen

im Kernsphäroid unterscheiden sich hierbei nicht von der Kontrolle. Somit steht fest, dass alle Zellen der äußeren Region absterben und dass alle Müllerzellen sich in den Kernsphäroid zurückziehen.

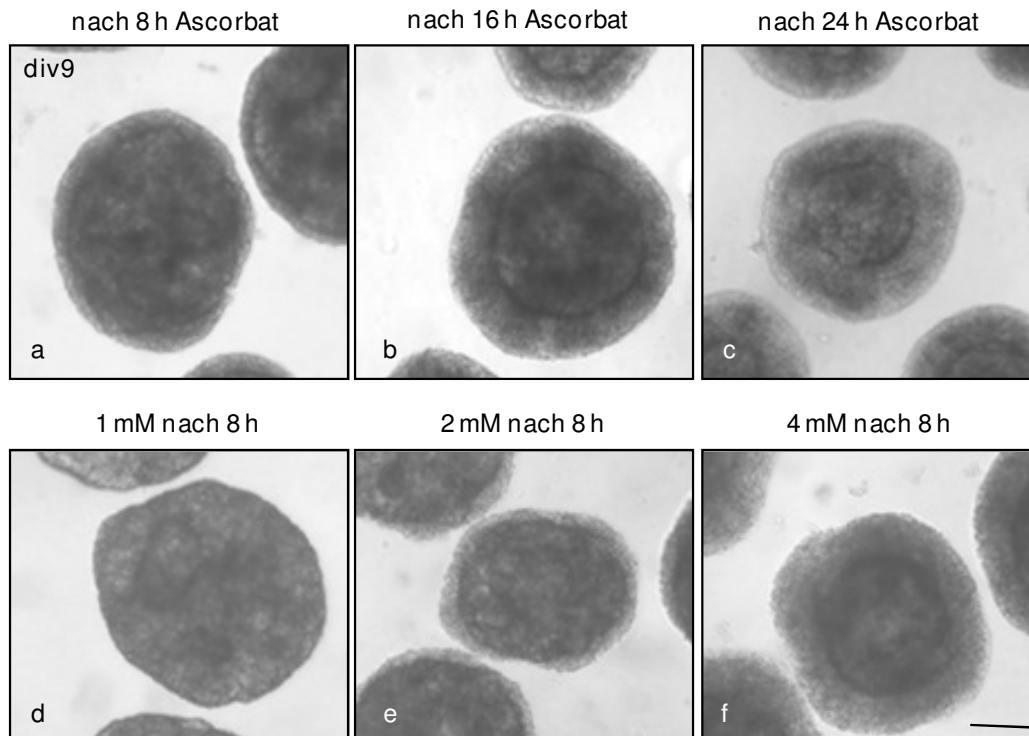


Abbildung 19. Konzentrations- und Zeit-Abhängigkeit des Ascorbat-Effektes. Innerhalb von 8 - 24 h ‚schrumpft‘ der Kern-Sphäroid zusammen und die äußere Region bildet sich (a-c). Die Wachstumsgeschwindigkeit der äußeren Region ist proportional zur Ascorbat-Konzentration (d-f). Maßstab: 200 μm .

Die Bildung der „äußeren Region“ ist offenbar abhängig von der Behandlungsdauer und der Ascorbat-Konzentration. Um diese These zu überprüfen, wurden Sphäroide zum einen mit unterschiedlichen Ascorbat-Konzentrationen (1, 2 und 4 mM) für 24 h behandelt und zum anderen mit 2 mM Ascorbat behandelt, bzw. zu verschiedenen Zeiten dokumentiert. Innerhalb von 2 Stunden war der erste Effekt von Ascorbat zu erkennen. Zu dieser Zeit wurde eine dünne „äußere Region“ sichtbar, die in den folgenden Stunden dicker wurde, während der Kernsphäroid in der gleichen Weise schrumpft (Abbildung 19). Dieses Wachstum der „äußeren Region“ nimmt mit der Dauer der Ascorbat-Behandlung ab, vermutlich wurde das Ascorbat im Medium verbraucht. Des Weiteren hängt die Wirkung auf die Sphäroide auch von der Ascorbat-Konzentration ab. Im Vergleich zu Sphäroiden, die mit 2 mM Ascorbat behandelt

wurden, zeigt 1 mM Ascorbat fast keine Wirkung und bei 4 mM Ascorbat ist die Ausprägung der „äußeren Region“ deutlich stärker.

Während dieser Studien wurde deutlich, dass Strukturen, die sich im Inneren des Gewebes befanden, auch nach der Ascorbat-Behandlung weiterhin intakt waren. Explantate und besonders Stratosphäroide bieten den Vorteil, dass sie keine diffusen Bereiche aufweisen und retinale Strukturen, wie eine IPL, nicht in der Nähe der Oberfläche zu finden waren. Die Photorezeptoren befinden sich bei beiden Systemen (Explantat und Stratosphäroid) auf der Gewebeoberfläche. Nur beim Explantatsystem kommen durch Zusammenrollen des Gewebes auch Photorezeptoren innerhalb des Explantates vor. Beide Systeme wurden ab Tag 8 *in vitro* mit 2 mM Ascorbat für 6 Stunden behandelt. Durch diese kurze Behandlungsdauer sollte nur die Oberfläche (Photorezeptoren) absterben, während die darunter liegenden Schichten unangetastet bleiben sollten. Die entsprechenden Kryoschnitte wurden gegen verschiedenen Marker (Pax6 = Amakrinzellen; Tubulin-III = Zytoskelett; CERN 901 = Photorezeptoren; GS = Müllerzellen und 3D10 = AChE) gefärbt, die gewisse Details der retinalen Struktur färben (Abbildung 20). Allein in der DAPI-Färbung fiel auf, dass die ONL (die auf der Gewebeaußenseite liegt) vollständig im Ascorbat-behandelten Stratosphäroid fehlt. Diese Studie zeigte schon im vorangegangenen Abschnitt (Gliederungspunkt 4.1.3), dass die Müllerzell-GS-Expression direkt abhängig ist vom Zell-Zell-Kontakt zu Photorezeptoren. Im Stratosphäroid-System befinden sich alle Photorezeptoren ausschließlich auf der Gewebe-Außenseite, die durch Ascorbat innerhalb von 6 Stunden fast vollständig absterben. Hin und wieder wies das Gewebe Invaginationen der ONL auf, in welchen die letzten Photorezeptoren die Ascorbat-Behandlung überlebt haben. Genau an diesen Stellen waren die Müllerzellen GS⁺. Bei der Betrachtung der anderen Marker zeigte sich, dass die IPL-Subbanden (3D10-Färbung) noch vollständig intakt waren. Die Schichtung der Amakrinzellen (Pax6) in der IPL erschienen hingegen nach der Ascorbat-Behandlung an einigen Stellen aufgelockert. Die Tubulin-III-Färbung färbt ONL-Strukturen um den Photorezeptor-Zellkörper (Müllerzellen). Nach der Ascorbat-Behandlung war die gesamte Struktur der ONL verschwunden und die Tubulin-III⁺-Zellfortsätze waren zurückgezogen. Nur Teile der OPL waren noch vorhanden. Die Abbildung 20 zeigt

nur Kryoschnitte von Stratosphäroiden, da die Explantat-Kryoschnitte dieselbe Erhaltung der Strukturen nach einer Ascorbat-Behandlung aufwiesen.

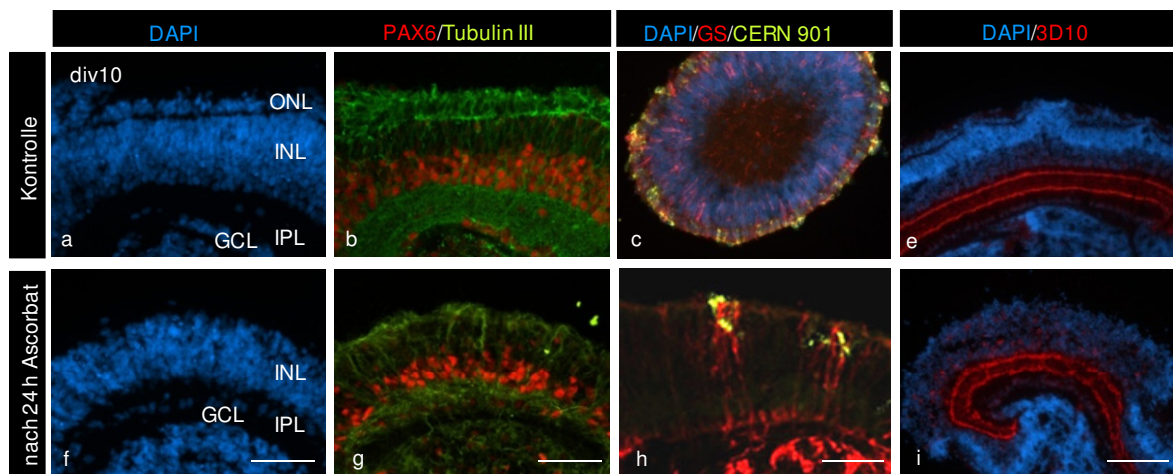


Abbildung 20. Ascorbat wirkt zuerst nur auf Neuronen des äußeren Gewebebereichs, während die IPL intakt bleibt. Gezeigt sind Kryoschnitte von Ascorbat-behandelten (e-h) Stratosphäroiden, die gegen Pax6, Tubulin-III, GS, CERN 901 und 3D10 gefärbt wurden. Beachte, dass 6 h Behandlungsdauer ausreichend ist, um die ONL zu beseitigen (vergl. A-c mit e-g) und tiefere Strukturen, wie die IPL-Subbanden, intakt zu lassen (h). Die GS-Expression ist abhängig vom direkten Zellkontakt zu Photorezeptoren (g). Maßstab: 50 µm.

4.1.5 Die Expression von Wachstumsfaktoren und Rezeptoren in Müllerzellen

Die Existenz von GDNF, BDNF und PEDF in Müllerzellen, wurde in anderen Organismen bereits nachgewiesen (173, 229). Um selbige im Huhn nachzuweisen, wurden nach Gliederungspunkt 3.2.6 reine Müllerzell-Monolayer erstellt und für eine Expressionsstudie per PCR-Amplifikation vorbereitet. Die Müllerzellen befanden sich 10 Tage in Kultur, bevor sie für die Expressionsstudie geerntet wurden. Um die Expression in aufgereinigten Müllerzellen vergleichen zu können, wurden zwei *in vivo*-Stadien (E6 und E14) mitgeführt. In Abbildung 21 wird eine umfassende Zusammenstellung der Expression von Wachstumsfaktoren und den bekannten Rezeptoren in Müllerzellen gezeigt (n=2). In gereinigten Müllerzellen des Huhnes wurden folgende Gene nachgewiesen: GDNF, GFR α 1, GFR α 2, Vimentin, GS, BDNF, TrkB, PEDF, Katalase, schwach GLUT1 und SVCT2. GFR α 3, GFR α 4 und GFAP zeigten keine Expression in Müllerzellen vom Huhn. GLUT1 und SVCT2 sind Gene, die für den Transport von Hydroascorbat bzw. Ascorbat in die Zellen verantwortlich sind. Katalase ist ein Protein, das in nahezu allen Zellen exprimiert wird. Seine enzymatische Aktivität schützt die

Zellen vor oxidativem Stress durch Anreicherung von H_2O_2 und oxidiert H^+ -Donatoren (z.B. Methanol, Ethanol, Methansäure, Phenole, etc.) unter Verbrauch von H_2O_2 (40). Die Müllerzellen sind dementsprechend im Huhn in der Lage, auf BDNF und GDNF zu reagieren. Für PEDF konnte keine Aussage getroffen werden, da der Rezeptor für PEDF bislang nicht identifiziert wurde.

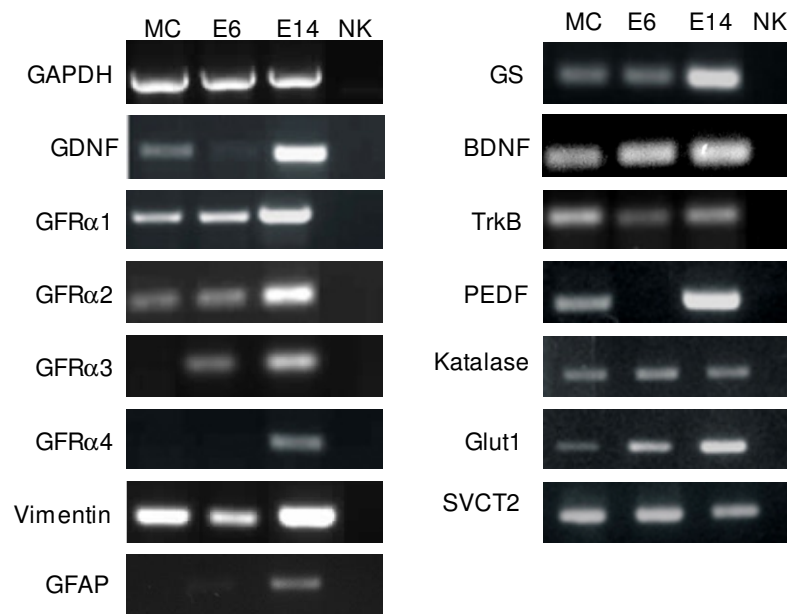


Abbildung 21. mRNA-Expression verschiedener Gene in Müllerzellen im Vergleich zur E6 und E10 *in vivo* Retina. Betrachtet wird die Genexpression von verschiedenen Genen im reinen Müllerzell-Monolayer und zwei *in vivo* Stadien (E6 und E14). In Müllerzellen werden alle Gene, mit Ausnahme von GFRα3 und GFRα4, exprimiert. (n=2) MC: Müllerzellen. NK: Negativkontrolle.

Aus den Expressionsstudien in Abschnitt 4.1.2 ist bekannt, dass PEDF *in vivo* und auch *in vitro* erst sehr spät exprimiert wurde. In Müllerzellen war allerdings eine deutliche Expression zu erkennen, auch wenn sie schwächer war als bei E14. Hierbei ist zu bedenken, dass PEDF nicht nur in Müllerzellen gefunden wurde, sondern auch in anderen Zellen, z.B. in der Ganglienzell- und der Photorezeptoren-Schicht (133). Somit wird in dieser Studie nur der Müllerzell-Anteil dargestellt wird.

Auch wenn reine Müllerzellen in der Immunhistologie keine Färbung gegen Glutaminsynthetase (GS) zeigten, wurde dennoch eine gewisse Basis-Expression in Müllerzellen gefunden. Diese Basis-Expression konnte mittels Immunfärbung nicht detektiert werden. Darüber hinaus ist die GS-Expression in Müllerzellen in etwa genauso stark, wie die GS-Expression zum embryonalen Tag 6 (E6) *in vivo*. Die GS ist allerdings erst ab E14 gegen GS-Antiserum anfärbbar. Also existiert auch *in vivo* eine gewisse Basis-Expression, die nicht mit Antikörpern sichtbar ist.

4.2 *Loss-of-function*-Analysen von Müllerzellfunktionen durch DL- α -Aminoadipat (AAA)

Müllerzellen spielen für die Entwicklung und Erhaltung der retinalen Struktur eine wichtige Rolle. Neben der Struktur ist besonders die Zellkommunikation zwischen Gliazellen und Neuronen für die Therapierung von Retina-degenerativen Krankheiten von besonderem Interesse. Nahezu alle Retina-degenerativen Krankheiten werden durch eine Gliose begleitet, deren Ausprägung über den Verlauf der Erkrankung mitbestimmt. In diesem Kapitel wird ein Müllerzell-Toxin verwendet, welches unter Kulturbedingungen einen glioseartigen Zustand erzeugt. Im zweiten Teil wird die Veränderung des Expressionsmusters von relevanten Genen unter AAA-Einfluss näher untersucht.

4.2.1 Konzentrationsabhängige Wirkung von Aminoadipat (AAA) auf Sphäroide und Explantate

DL- α -Aminoadipat (AAA) ist ein spezifisch auf Müllerzellen wirkendes Toxin. Bei Behandlung der Retina mit AAA schwellen die Müllerzellen gliotisch an, gefolgt von Zelltod. Die Wirkung von AAA auf retinales Gewebe ist von der Konzentration abhängig (63). In Abbildung 22 wurden Sphäroide mit verschiedenen AAA-Konzentrationen permanent behandelt und nach 10 Tagen *in vitro* fixiert. Alle 2 Tage wurde das Medium gewechselt und dabei auch neues AAA zugesetzt. Gezeigt ist eine Doppelfärbung gegen den Müllerzell-Marker Glutaminsynthetase (GS) und Stäbchen-Photorezeptoren (CERN 901). Mit steigender AAA-Konzentration verringert sich zunächst das Vorkommen an Rosettenstrukturen. Bei 1 mM AAA wurden keine Rosetten mehr beobachtet. Die Rosetten sind Flüssigkeits-gefüllte Hohlräume im Sphäroid, dessen Oberfläche mit Photorezeptoren ausgekleidet ist. Diese Struktur ist vergleichbar mit der ONL in der *in vivo*-Retina. Neben den Rosetten wiesen die Sphäroide auch IPL-artige Strukturen mit *displaced* Amakrinzellen im Zentrum auf. Diese IPL-Strukturen verschwanden, im Gegensatz zu den Rosetten, erst bei höheren AAA-Konzentrationen (2 mM AAA). AAA ist ein Müllerzell-Toxin, das deren Morphologie erheblich verändert. Die radiäre Ausdehnung der Müllerzell-Fortsätze verringerte sich mit steigender AAA-Konzentration. Schon bei 2 mM AAA war eine radiäre

Struktur von Müllerzellen nicht mehr zu sehen. Dabei waren die Müllerzell-Fortsätze wesentlich kürzer und die Zellen waren insgesamt deutlich angeschwollen (ab 1 mM AAA). Das Anschwellen der Müllerzellen ist auch bei der Müllerzell-Gliose beschrieben worden. Im Laufe dieser Arbeit wird näher ergründet, wie AAA eine Gliose verursacht.

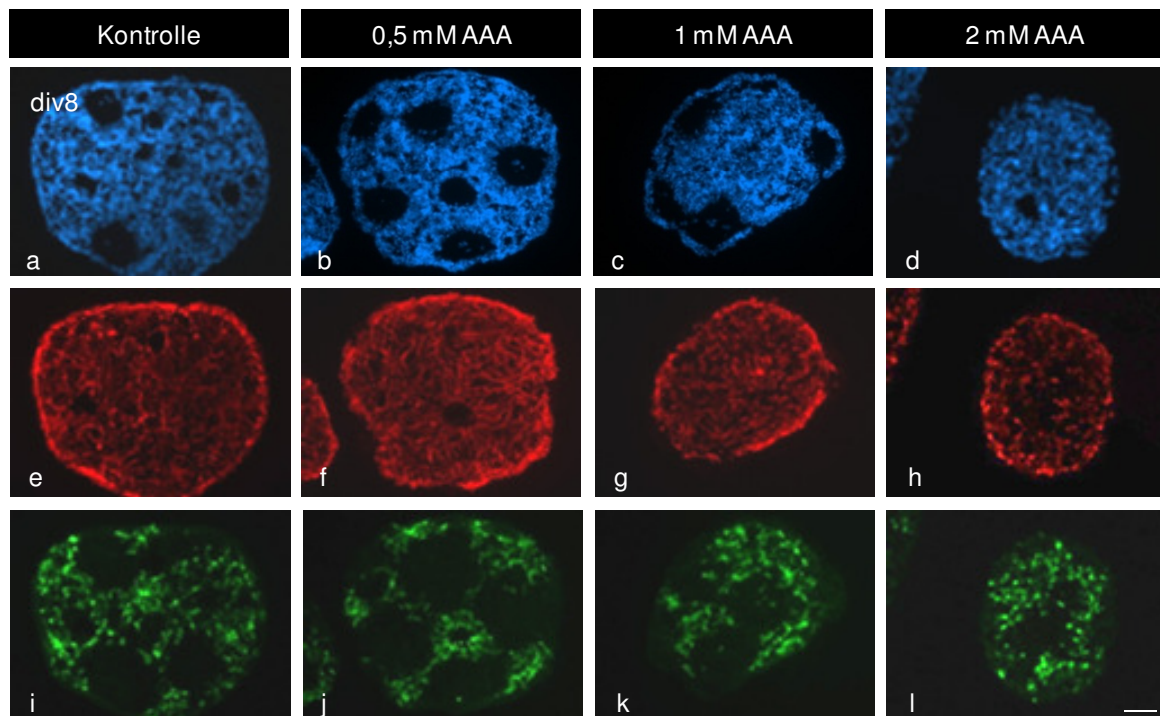


Abbildung 22. Reaktion von Rosettensphäroiden auf unterschiedliche AAA-Konzentrationen. Div8 Sphäroid-Kryoschnitte wurden immunhistochemisch gegen GS (e-h; rot), CERN 901 (i-l; grün) und mit DAPI (a-d; blau) gefärbt. Mit steigender AAA-Konzentration sinkt die radiäre Struktur der Müllerzellen und es bilden sich weniger Rosetten- und IPL-Bereiche. Maßstab: 50 μ m.

Es hat den Anschein, dass mit ansteigender AAA-Konzentration die Anzahl an Photorezeptoren steigt. Dieser Effekt bestätigt sich aber bei genauer Betrachtung nicht. Durch AAA stieg der Anteil an diffusen Bereichen und die Photorezeptoren waren dabei großflächig verteilt. In den geordneten Strukturen der Rosetten waren die Photorezeptoren dicht gepackt und nahmen weniger Fläche ein; somit erschienen sie unter AAA vermehrt. Auffällig war, dass der Durchmesser der Sphäroide mit steigender AAA-Konzentration abnimmt. In einer statistischen Auswertung (Abbildung 23) wird die Verringerung des Sphäroid-Durchmessers verdeutlicht. Für die Auswertung wurden mind. 30 Sphäroide pro Messwert verwendet. Bei einer AAA-Konzentration von 0,5 mM zeigte sich noch keine Verringerung des Sphäroid-Durchmessers, aber ab einer Konzentration von 1 mM

AAA verringerte sich der Durchmesser um mehr als 30%. Bei höheren AAA-Konzentrationen verringerte sich der Durchmesser proportional zur AAA-Konzentration.

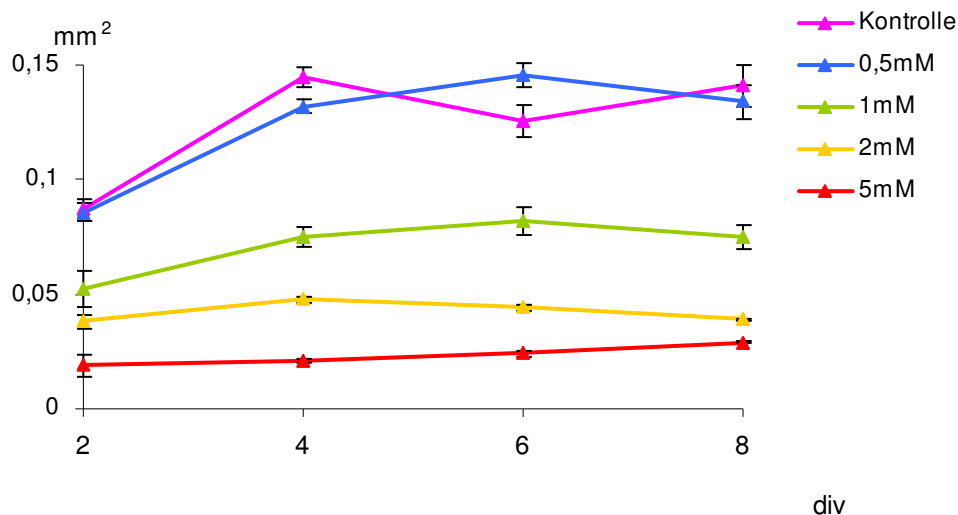


Abbildung 23. AAA verringert das Sphäroidwachstum mit steigender Konzentration. Sphäroidkulturen wurden mit unterschiedlichen AAA-Konzentrationen behandelt und im Lichtmikroskop zu div2, 4 und 8 für die statistische Auswertung mit ImageJ dokumentiert. Beachte die proportionale Verringerung des Sphäroiddurchmessers in Abhängigkeit zur AAA-Konzentrationen (n=30) +/- SD.

Um die Ergebnisse aus den Sphäroiden mit den kommenden Experimenten im Explantatsystem vergleichen zu können, wurden entsprechende AAA-behandelte Explantate erstellt. Abbildung 24 zeigt Explantat-Kryoschnitte von div8, gefärbt gegen Photorezeptoren (CERN 901) und Müllerzellen (GS). In der Zellkernfärbung DAPI ist deutlich zu erkennen, dass die INL in Abhängigkeit zur AAA-Konzentration 'aufgerissen' wurde. Darüber hinaus sinkt der Grad der retinalen Organisation mit steigender AAA-Konzentration. Bei 2 mM AAA war die ONL vollständig mit der INL verschmolzen und bei 4 mM waren keine plexiformen Bereiche mehr zu erkennen.

Der Photorezeptoren-Zellkörper ist in Müllerzell-Fortsätzen zwischen OLM und OPL eingebunden. Die inneren und äußeren Segmente ragen durch die OLM heraus und sind *in vivo* im Pigmentepithel eingebettet, welches im Explantatsystem fehlt. Unter AAA ziehen sich die Müllerzell-Fortsätze der ONL zurück, und die Photorezeptoren verloren ihre parallele Anordnung in der ONL. Mit 1 mM AAA war die Organisation der Photorezeptoren nach 8 Tagen *in vitro* stark angegriffen, mit 2 mM AAA war die ONL kaum noch als apikaler Streifen zu

erkennen. Die Struktur der ONL war nur noch durch die Färbung der Photorezeptoren zu identifizieren. Eine Behandlung mit 4 mM AAA löste die Struktur ganz auf, teilweise waren die Photorezeptoren *displaced* in der IPL und sogar in der GCL zu finden. In vergrößerten Ansichten der Kontrolle und von 4 mM AAA wird deutlich, dass die Photorezeptoren diffus orientiert sind, die Ausbildung der inneren bzw. äußeren Segmente gestört war und somit Rhodopsin über den gesamten Photorezeptor verteilt war. Die Anzahl der Photorezeptoren scheint allerdings nicht beeinträchtigt.

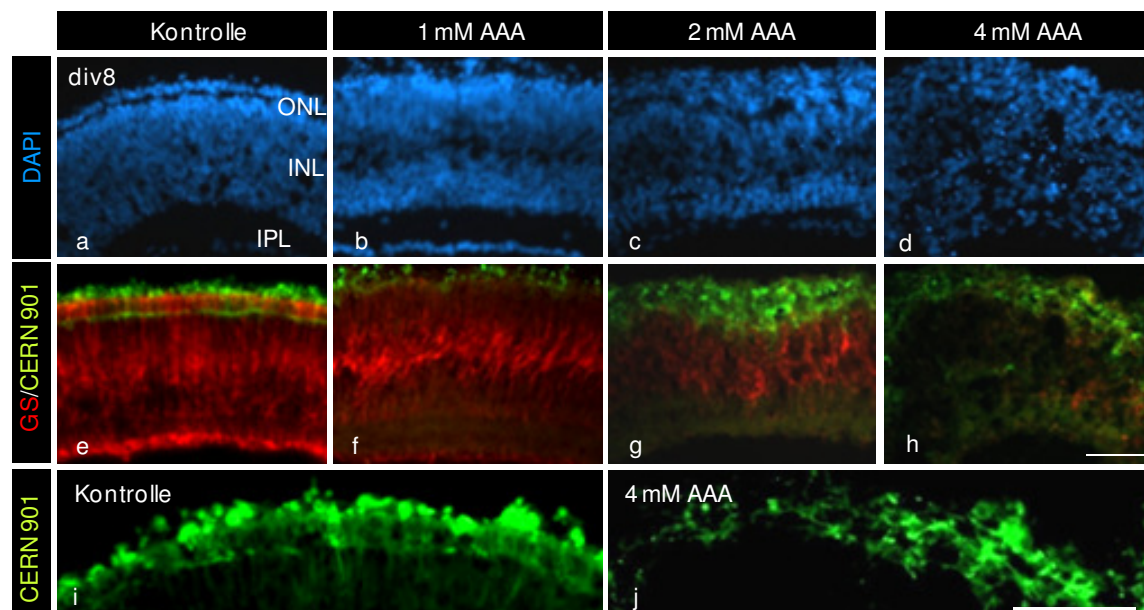


Abbildung 24. AAA zerstört die parallele Anordnung der Photorezeptoren im Explantat bis div8. Explantate wurden mit verschiedenen AAA-Konzentrationen behandelt. Div8 Kryschnitte wurden gegen. Müllerzellen (GS; rot) und Photorezeptoren (CERN 901; grün) gefärbt (e-h), mit DAPI als Kernfärbung (a-d). Die Bilder i und j sind vergrößerte Ansichten von e und h. Mit steigender AAA-Konzentration sinkt die Organisation der Stäbchen in der ONL, sowie die Färbeintensität und die Struktur der Müllerzellen (e-h). Maßstab: 50 µm.

Für die weiteren Experimente mit AAA wurde eine Konzentration von 1 mM AAA verwendet. Bei 1 mM waren die Auswirkungen von AAA deutlich zu beobachten, aber die Retina war nicht so stark betroffen, dass sämtliche Strukturen verloren gingen, wie es bei 2 mM AAA der Fall war.

4.2.2 Amino adipat (AAA) wirkt stärker auf apikale als auf basale Strukturen

Um den Verlauf der AAA-Wirkung näher von AAA auf die einzelnen retinalen Strukturen zu erfahren, wurden die weiteren Experimente mit AAA am Explantat

durchgeführt. Sämtliche AAA-Explantat-Experimente basieren, sofern nicht anders angegeben, auf Präparationen des embryonalen Tags 6 (E6). Die Behandlung mit 1 mM AAA erfolgte direkt nach der Präparation, außer bei Studien, die den Zeitpunkt der AAA-Behandlung untersuchten.

Die mit AAA-behandelten Explantate zeigten im Durchlichtmikroskop über den gesamten Zeitraum der Kultivierung keine dramatische morphologische Veränderung. AAA-behandelte Explantate erschienen, im Vergleich zur Kontrolle, lediglich dunkler, was auf ein Absterben der Zellen hinweisen kann. Anders verhält es sich allerdings bei Fluoreszenzfärbungen von entsprechenden Kryoschnitten. Abbildung 25 zeigt Kryoschnitte von AAA-behandelten Explantaten, die mit DAPI bzw. gegen GS immunhistochemisch gefärbt wurden. Auffällig war in der DAPI-Färbung, dass sich im Laufe der AAA-Behandlung die INL in zwei zellkernhaltige Streifen aufteilt. Dieser 'Riss' in der INL bildet sich ab dem 4. Tag *in vitro* und weitet sich bis Kulturtag 10 aus. Nur vereinzelt waren kleine Lücken in der INL auch in Kontroll-Explantaten zu erkennen, die allerdings nichts mit dem 'Riss' nach AAA-Behandlung gemeinsam haben. Im Bereich des 'INL-Risses' befinden sich die Zellkörper der Müllerzellen, die zu beiden Seiten der Retina (basal und apikal) ihre Zellfortsätze ausstrecken. In der GS-Färbung wurde deutlich, dass der 'Riss' fast vollständig mit GS⁺-Strukturen angefüllt war. Die Müllerzellen waren angeschwollen, ähnlich wie bei einer Gliose. In der Kontrolle war die GS-Färbung an den basalen und apikalen Enden der Müllerzellen (OLM, OPL und ILM), sowie um den Zellkern herum in der INL zu sehen. Diese starken GS⁺-Bereiche waren mit feinen GS⁺-Zellfortsätzen verbunden. Mit der AAA-Behandlung verdichtet sich die GS-Färbung um den Zellkörper im 'Riss' (die Müllerzelle schwillt an), während die GS-Färbung im Bereich der OLM und OPL reduziert war. Es ist zu vermuten, dass die äußeren Zellfortsätze der Müllerzellen zurückgezogen werden. Auch die gesamte Struktur der ONL scheint durch AAA an Organisation verloren zu haben. Hierbei scheinen die Müllerzell-Fortsätze der apikalen Retinahälfte deutlich stärker von der AAA-Behandlung betroffen zu sein, als die basalen. Die ILM und OLM wird durch die Endfüße der Müllerzellen gebildet. Unter AAA-Einfluss ist die ILM weiterhin als GS-gefärbte Struktur zu erkennen, während die OLM fehlt. Ein ähnliches Bild zeigt sich in der Vimentin-Färbung (Abbildung 25). Vimentin ist ein Marker für Müllerzell-Vorläufer, der in frühen Stadien (vor E6) allerdings auch

neuronale Vorläufer anfärbt und sich erst im Laufe der Entwicklung auf Müllerzellen beschränkt. Vimentin ist als ein Müllerzell-`Endfußmarker´ bekannt, der aber die dünnen Zwischenbereiche in der INL deutlich stärker anfärbt als die GS, sodass die gesamte Zellstruktur der Müllerzellen mit Vimentin besser zu

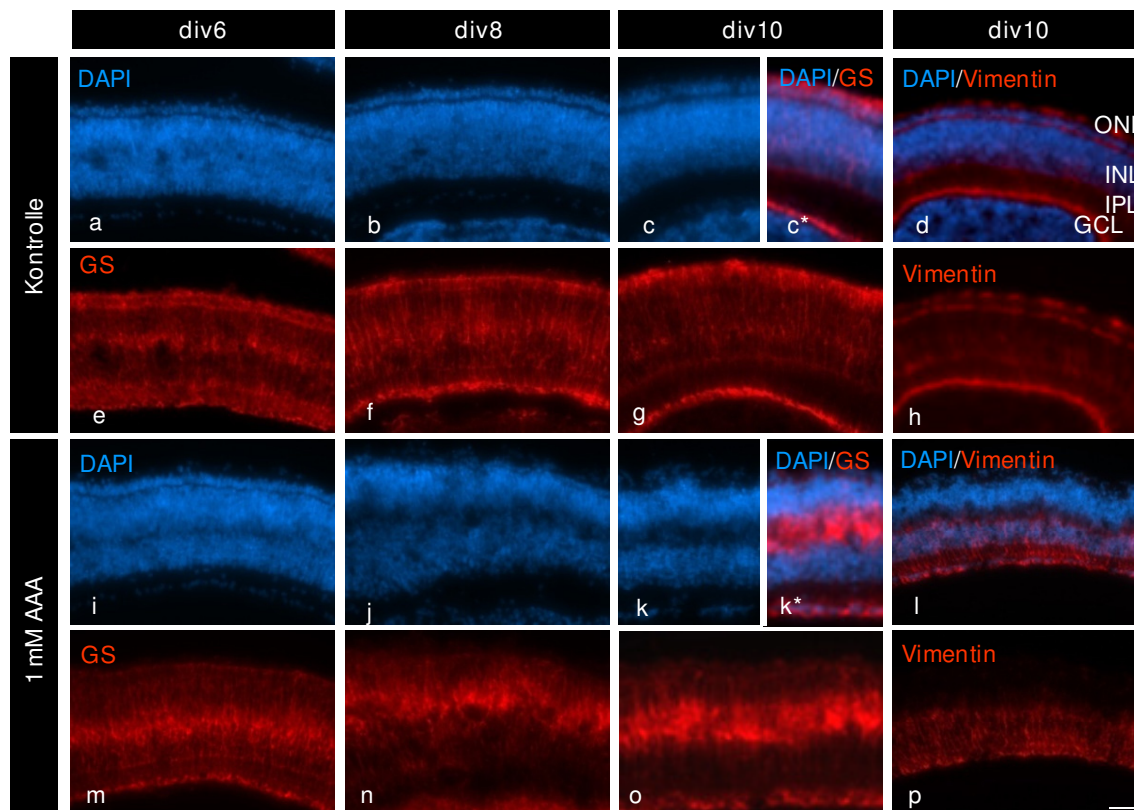


Abbildung 25. Müllerzellen schwellen unter 1 mM AAA an und erzeugen einen ‚Riss‘ in der INL im Explantatsystem zwischen Kulturtag 6 und 10. Kryoschnitte von Kontroll-Explantaten (a-h) und AAA-Explantaten (i-p) wurden gegen GS (e-g und m-o) und Vimentin (h und p) gefärbt, mit DAPI (a-d; i-p) als Kernfärbung. Die Bilder c* und k* zeigen eine Überlagerung von k und c bzw. g und o. Der ‚INL-Riss‘ ist angefüllt von GS⁺-Müllerzellen (k*). Apikale Müllerzell-Strukturen sind stärker von AAA betroffen als basale (vergl. G und h mit o und p). AAA stört die Erhaltung der ONL (i-k). Maßstab: 20 µm.

beobachten ist. Die Vimentin-Färbung ist besonders stark in der OPL, der OLM und in der ILM zu erkennen. Auch die Vimentin-Färbung zeigte, dass AAA wesentlich stärker auf die apikale Seite der INL einwirkt. Unter dem Einfluss von AAA waren sämtliche Vimentin⁺-Müllerzell-Fortsätze der apikalen Hälfte der Retina abwesend. Die Kontrolle dagegen wies langgestreckte Vimentin⁺-Zellfortsätze auch in der apikalen Hälfte auf.

Abbildung 25 gibt eindeutige Hinweise, dass die apikalen Strukturen wesentlich stärker von der toxischen Wirkung von AAA betroffen sind als basale. Im apikalen Bereich der Retina befinden sich die Photorezeptoren. Ihre Zellkörper sind umschlossen von Müllerzell-Fortsätzen, die auch gleichzeitig die apikal liegende OLM bilden. Müllerzellen bilden neben der OLM auch die basal liegende ILM, die eine Grenze zwischen Retinagewebe und dem Glaskörper bildet. Die ILM ist eine eng gestapelte dünne Schicht aus Müllerzell-Fortsätzen. Anders als die ILM (basal), ist die OLM (apikal) ein schmaler Streifen mit einer starken Ansammlung von Mikrotubuli. Die Entwicklung der OLM lässt sich besonders gut mit dem F11-Antikörper gegen intrazelluläres neurales Filament darstellen (Abbildung 26). Die OLM ist zum Zeitpunkt der Präparation und in den folgenden Kulturtagen bis Tag 8 *in vitro* nicht F11⁺, also noch nicht entwickelt. In dieser Zeit wurde nur die OPL und IPL als deutlicher F11⁺-Streifen gefärbt. Am Kulturtag 8 beginnt sich die F11⁺-OLM zu bilden und war am Kulturtag 10 als schmaler F11⁺-Streifen zu sehen. Unter dem Einfluss von 1 mM AAA bildete sich die OLM nicht. Gleichfalls war die OPL von der AAA-Behandlung stark in Mitleidenschaft gezogen worden. Sie war in einigen Bereichen zwar noch zu erkennen, zeigte aber deutliche Löcher in der

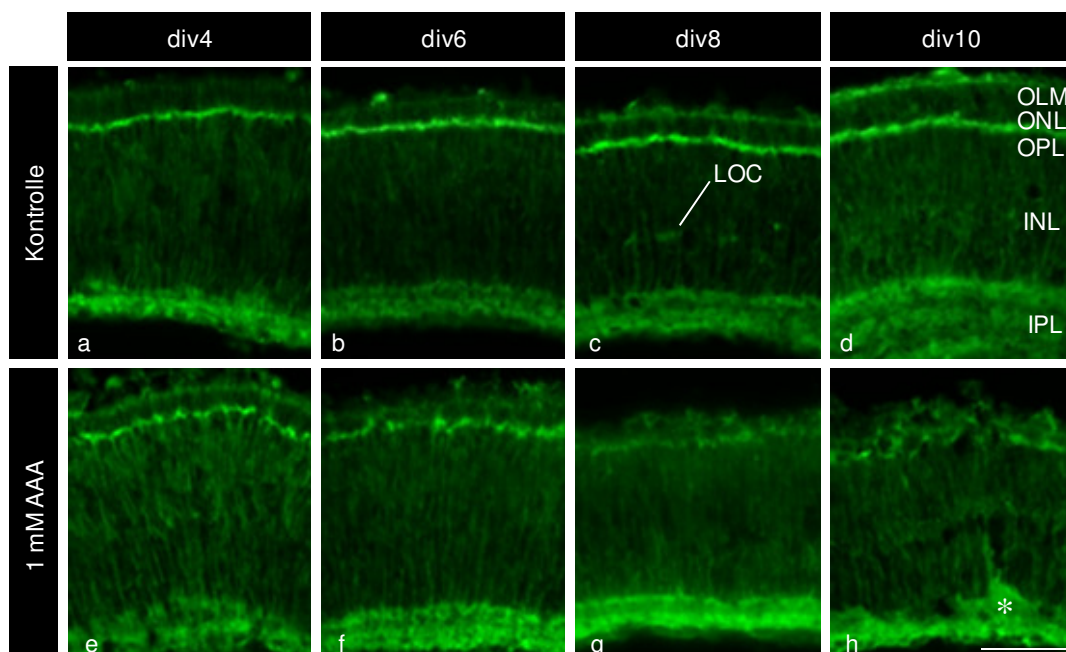


Abbildung 26. AAA verhindert die OLM-Bildung im Explantat. Explantate wurden mit 1 mM AAA behandelt. Kryoschnitte von div4-10 wurden gefärbt gegen F11. Beachte, dass unter anhaltendem AAA-Einfluss die ONL an Struktur verliert (e-h) und die OLM nicht gebildet wird (vergl. D und h). Ab div10 treten Störungen in der IPL auf (h; Stern). LOC: *Layer of Chievitz*. Maßstab: 50 µm.

F11-Färbung. Ab Tag 8 *in vitro* waren die OLM und OPL zu einem diffusen Komplex verschmolzen. Darüber hinaus reduzierte sich die Intensität der F11-Färbung mit fortschreitender AAA-Behandlung und die Organisation der ONL ging verloren. Die IPL blieb über den gesamten Zeitraum scheinbar unbeeinflusst, lediglich am Kulturtag 10 traten Störungen auf; vereinzelt traten auch diffuse Auswüchse in der IPL auf (Abbildung 26 h, Stern).

4.2.3 Fortgeschrittene Aminoacidipat (AAA)-Gliose führt zum Absterben der Müllerzellen

Wie der vorangegangene Abschnitt zeigt, lässt AAA die Müllerzellen gliotisch anschwellen, verbunden mit dem Einziehen der Müllerzell-Fortsätze und dem Verlust der retinalen Struktur (Abbildung 25 und Abbildung 26). Es stellte sich die Frage, ob die angeschwollenen Müllerzellen in die Apoptose übergehen. Der Zelltod kann durch einen TUNEL-Test sichtbar gemacht werden. Entsprechende Kryoschnitte wurden auf ein gesteigertes Vorkommen der TUNEL⁺-Zellen in der INL (im 'Riss') untersucht (Abbildung 27). In den frühen Kulturtagen (div2 – 4) zeigten sich kaum Auffälligkeiten zwischen Kontrolle und der Behandlung mit 1 mM AAA. Nur in der INL waren mehr TUNEL⁺-Zellen in den AAA-behandelten Explantaten zu sehen. Ebenfalls auffällig war das massive Absterben der Ganglienzellen in der GCL. Das Absterben der Ganglienzellen wurde durch AAA nicht beeinflusst. Der für AAA charakteristische 'Riss' war am Tag 4 *in vitro* noch nicht entwickelt. Erst am Tag 6 *in vitro* hatte sich der 'INL-Riss' gebildet und auch der TUNEL-Test zeigte einen deutlichen Unterschied zwischen Kontrolle und AAA-Behandlung. Die Kontrolle zeigte wenige TUNEL⁺-Zellen in der INL, deren Anteil sich nach AAA-Behandlung deutlich erhöhte. Die meisten TUNEL⁺-Signale waren mittig in der INL zu finden, wo die Zellkörper der Müllerzellen zu finden waren. Auch hierbei reagierten die Müllerzellen auf AAA durch Anschwellen ihres Zellkörpers und dem Zurückziehen der apikalen Zellfortsätze, gefolgt vom Absterben der Zelle.

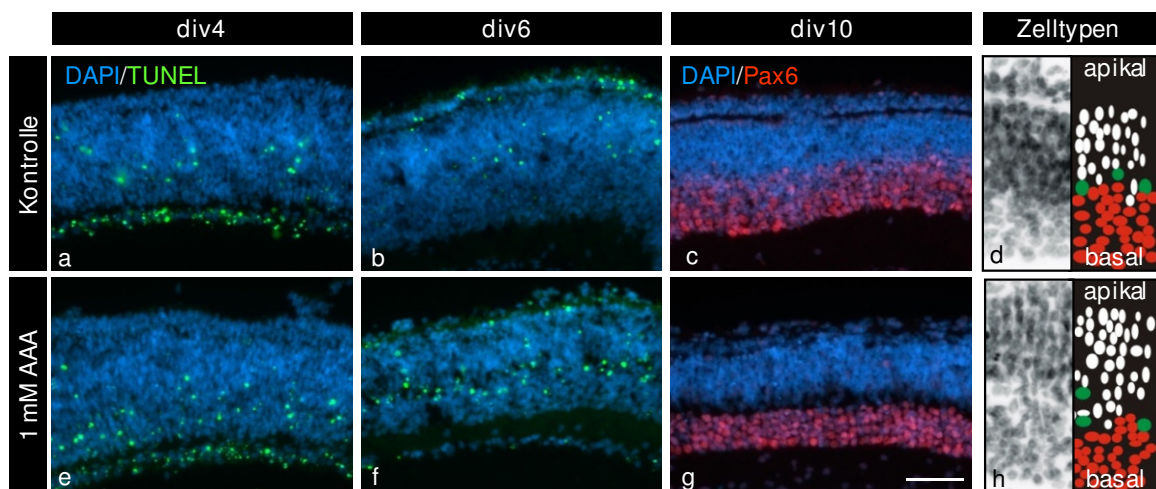


Abbildung 27. AAA steigert die Apoptosen im ‚INL-Riss‘ und bildet einen PAX6⁺-Zellstreifen. Kryoschnitte von AAA behandelten Explantaten wurden mit dem TUNEL-Test (a-b, e-f; grün) und gegen Pax6 (c, g rot) gefärbt, mit DAPI (blau) als Kernfärbung. Die Schemabilder d und h verdeutlichen die Aufspaltung der Amakrinzellen (rot), Müllerzellen (grün), Bipolarzellen und Horizontalzellen (weiß) in der INL. Beachte die höhere Anzahl TUNEL⁺-Signale in der Nähe vom ‚Riss‘ (vergl. B mit f) und die scharfe Abgrenzung der Pax6⁺-Amakrinzellen vom Rest der INL (vergl. c mit g) Maßstab: 50 µm.

Bei genauer Betrachtung der DAPI-Zellkerne wird deutlich, dass der o.g. ‚Riss‘ zwei Populationen von Zellen trennt. Amakrinzellen besitzen einen recht runden Zellkern, während Horizontalzellen und Bipolarzellen einen langgestreckten Zellkern haben. Müllerzellen fallen dabei deutlich mit ihrem sehr großen Zellkern auf. Die Orientierung in der Retina (Explantat) stellte sich wie folgt dar: auf der basalen Seite der INL befanden sich die Amakrinzellen, auf der apikalen Hälfte die länglichen Zellkerne der Horizontal- und Bipolarzellen und zwischen diesen beiden Populationen befanden sich die großen Zellkerne der Müllerzellen. Bei *in vivo*- und *in vitro*-Retina erschien die apikale Hälfte als deutlich dichter gepackt als die basale Hälfte. Im Normalfall waren die Grenze zwischen dichtgepackten Zellkernen und der basalen ‚lockeren‘ Hälfte fließend. Unter Einfluss von AAA rieß die INL genau an der Grenze zwischen diesen zwei Populationen auseinander. Zur Verdeutlichung der Sortierung der Zelltypen unter AAA-Behandlung wurde ein Amakrinzell-Marker (Pax6) verwendet. Der Pax6-Antikörper färbte intensiv alle Amakrinzellen in der INL und GCL. Horizontalzellen und Bipolarzellen wurden mit Pax6 nur schwach gefärbt. Die Kontroll-Explantate zeigten, dass sich die Pax6⁺-Amakrinzellen auf der basalen Hälfte der INL konzentrieren und dass die Grenze zwischen Pax6⁺- und Pax6 negativ-Zellen sich nicht scharf darstellte (Abbildung 27). Mit AAA spaltete sich die INL jedoch direkt an der Grenze zwischen Pax6⁺-

und Pax6 negativ-Zellen, wobei die Pax6⁺-Zellen sehr dicht gepackt erschienen. In allen untersuchten Ansätzen gab es nur vereinzelte Ausnahmen, die Pax6⁺-Zellen auf der apikalen Seite zeigten. Unter AAA erschien die Pax6⁺-Schicht höher organisiert, obwohl eine Kolumnen-Struktur unter AAA nicht erkennbar war.

4.2.4 Zeitabhängige Wirkung von AAA im Explantatsystem

AAA besitzt eine interessante Eigenschaft, wenn es zu verschiedenen Zeitpunkten zugegeben wurde. Bisher wurden alle Experimente mit E6-Embryonen unternommen und die AAA-Behandlung am ersten Tage begonnen. Im Folgenden werden Explantate von späteren embryonalen Stadien präpariert und mit den herkömmlichen Präparaten (E6) verglichen. Hierbei wurden zum einen E6-Explantate 8 Tage mit 1 mM AAA behandelt und zum anderen E15-Explantate für nur 24 Stunden 1 mM AAA ausgesetzt. Die entsprechenden Kryoschnitte wurden gegen Müllerzellen (GS) und Stäbchen-Photorezeptoren (CERN 901) immunhistochemisch gefärbt und ferner mit der Karnovsky-Roots-Färbetechnik gegen die AChE-Aktivität gefärbt (Abbildung 28). Bei den E6-Explantaten war die bereits beschriebenen gliotischen Auswirkungen von AAA auf Müllerzellen zu sehen. Die Müllerzellen waren angeschwollen und die ONL wirkte unstrukturiert. Auch in der Karnovsky-Roots-Färbung zeigte sich eine massive Störung der IPL-Subbanden a und d. Die Explantate der E15-Präparation zeigten ein dramatisches Aufreißen der INL unter AAA-Einfluss. Hierbei handelte es sich nicht um Artefakte beim Schneiden, sondern um eine massive Degeneration der Müllerzellen. Die Struktur der Müllerzellen waren zudem nicht mehr zu erkennen. Bei der rötlichen Färbung (GS-Färbung) handelte es sich vermutlich nicht um verzerrte Müllerzell-Strukturen, sondern um eine unspezifische Hintergrundfärbung. Die Photorezeptoren waren bei der E15-Präparation diffus in der noch teilweise sichtbaren ONL verteilt. Die Subbanden der IPL (Karnovsky-Roots-Färbung) waren teilweise noch zu erkennen. Hierbei ist zu bedenken, dass sich die Subbanden a und d schon vor der Präparation (zu E15) und der AAA-Behandlung gebildet haben und dass diese Explantate nur 24 Stunden einer AAA-Behandlung ausgesetzt wurden. Retinales Gewebe ist offenbar im frühen embryonalen Stadium wesentlich resistenter als in späteren Stadien.

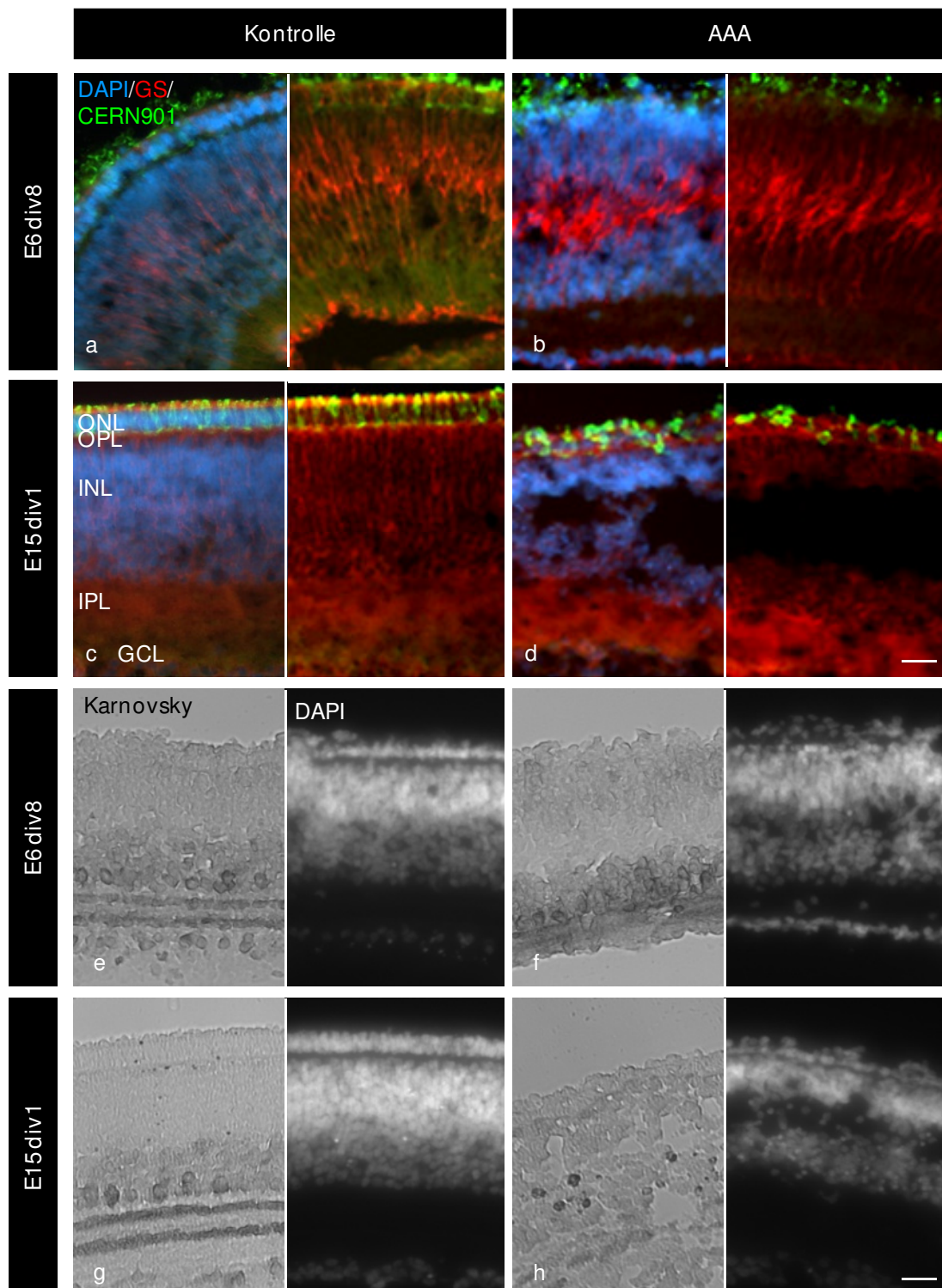


Abbildung 28. AAA wirkt toxischer zu späten als zu früheren Stadien der *in vitro* Entwicklung. Explantate von E6 und E15 wurden mit 1 mM AAA behandelt. Kryoschnitte von div8 (E6) und div1 (E15) wurden gegen GS (rot) und Stäbchen (CERN 901; grün) gefärbt (a-d). Die Bilder e bis h zeigen eine AChE (Karnovsky-Roots)-Färbung von E6 und E15 Explantaten. Die Bilder sind zur Hälfte mit der Kernfärbung DAPI (blau und weiß) überlagert. Beachte die fehlende Müllerzell-Struktur in den E15 Explantaten im Vergleich zu E6 Explantaten (b und d). Die Subbanden und die retinale Struktur sind in E15 Explantaten stärker angegriffen als bei E6 Explantaten (vergl. f mit h). Maßstab: 50 μ m.

4.2.5 *Layer of Chievitz* wird nicht durch AAA erzeugt

Bei immunhistochemischen Färbungen gegen F11 war hin und wieder die Chievitz'sche Zwischenschicht (Layer of Chievitz, LOC) (230) aufgetaucht. Es zeigte sich, dass der durch AAA ausgelöste 'INL-Riss' nichts mit der LOC gemeinsam hatte. Hierzu wurden alle Schnitte auf das Vorkommen der LOC untersucht. Zwei Beispiele wurden in Abbildung 29 zusammengestellt. Beide Explantat-Kryoschnitte waren mit AAA behandelt und gegen Amakrinzellen (Pax6) und F11 gefärbt. Die LOC trat auch in AAA-unbehandelten Explantaten auf. Die Häufigkeit der LOC in den Kontrollen und AAA-behandelten Explantaten zeigte, dass AAA keine LOC induziert. In einem AAA-behandelten Beispiel ist keine LOC zu sehen. Dagegen wurde der F11 negativ-'INL-Riss' durch AAA ausgebildet. Das andere Beispiel zeigt ein AAA-Explantat mit LOC. Hier ist besonders interessant, dass die LOC nicht die Grenzschrift zwischen Amakrinzellen und Bipolar-/Horizontalzellen bildet. Bei genauer Betrachtung liegt die LOC unterhalb der ersten Pax6⁺-Zellschicht. Hingegen spaltet der 'INL-Riss' die INL genau zwischen der Pax6⁺- und Pax6 negativ-Zellen. Zudem war der 'INL-Riss' F11 negativ und die LOC F11⁺.

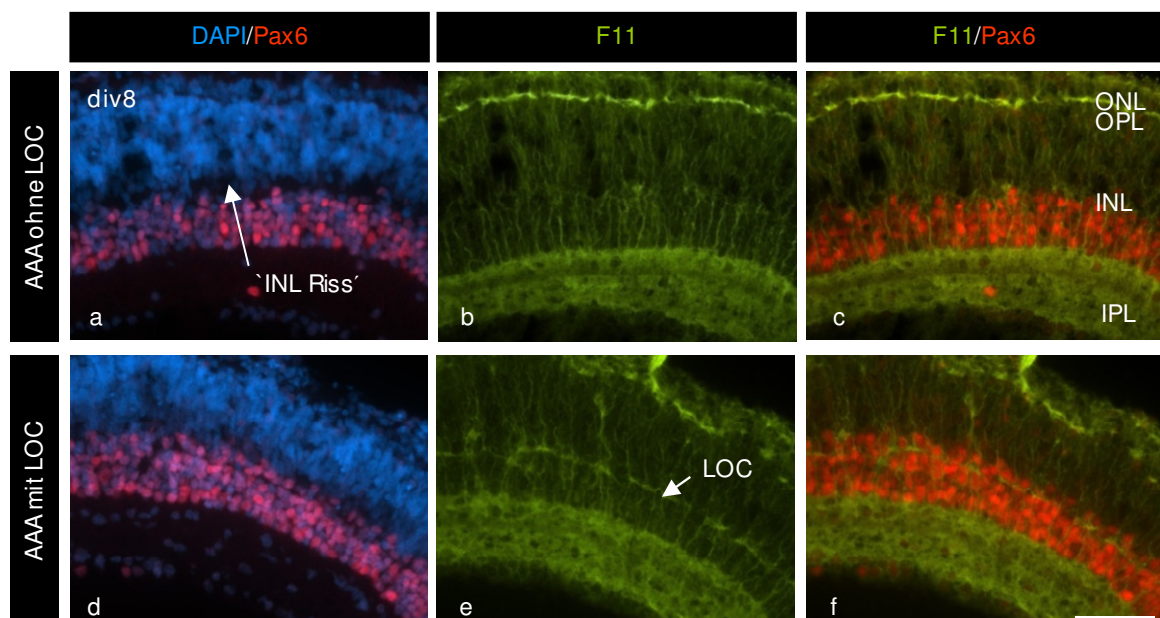


Abbildung 29. Der durch AAA erzeugte 'INL-Riss' ist nicht identisch mit der Chievitz-Schicht (LOC). Gezeigt sind zwei AAA-behandelte Explantate in Kryoschnitt-Färbung gegen Pax6 (a, c, d, f) und F11 (a-c und d-f; grün) mit DAPI (blau; a, d) als Kernfärbung. Beachte, dass die LOC sich unter der ersten Pax6⁺-Zellschicht befindet, und der F11⁻ 'INL-Riss' apikal von den Pax6⁺-Zellen liegt. Kernfärbung DAPI in blau. Maßstab: 50 µm.

4.2.6 Amino adipat (AAA) erzeugt oxidativen Stress, welcher zur Müllerzell-Gliose führt

Oxidativer Stress wird neben dem GSH-System auch durch das Enzym Katalase abgepuffert. Katalase ist ein Protein, das in nahezu allen Zellen exprimiert wird. AAA wirkt der Produktion von GSH entgegen, was zu einem Anstieg an H_2O_2 führt (für Details siehe Einleitung DL- α -Amino adipat das Müllerzell-Toxin). Der hieraus entstehende oxidative Stress in den Müllerzellen, führt zum Absterben der Müllerzellen. Um zu überprüfen, ob 1 mM AAA oxidativen Stress erzeugt, wurden zu den entsprechenden Kulturtagen (4-10) Proben gesammelt und für einen Katalase-Test nach Aebi verwendet (209) (Abbildung 30). Untersucht wurden unbehandelte Kontroll-Sphäroide sowie Sphäroid-Kulturen, die ab der Präparation kontinuierlich mit 1 mM AAA behandelt wurden. Jeder Messwert besteht aus 6 unabhängigen Proben (6 separate Kulturschalen mit Explantaten oder Sphäroiden), die in gleicher Weise auf oxidativen Stress untersucht wurden. Eine Behandlung mit 0,5 mM H_2O_2 für 18 h diente für dieses Experiment als Positivkontrolle. Bei oxidativem Stress steigt die Katalase-Aktivität als Reaktion auf H_2O_2 an. Die Enzymaktivität wurde photometrisch bestimmt und die hieraus ermittelten Enzymeinheiten sind proportional zum oxidativen Stress. Abbildung 30

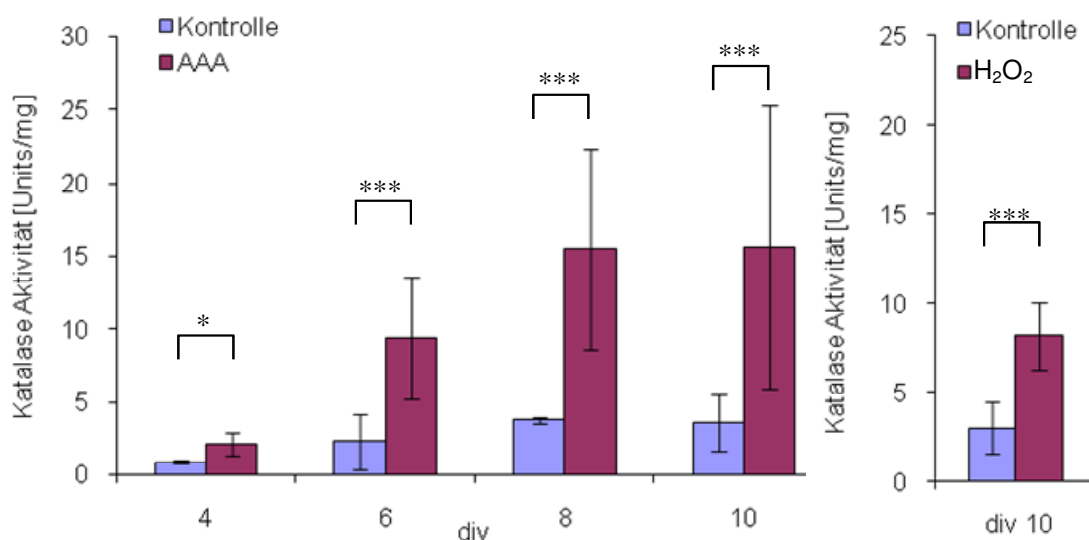


Abbildung 30. AAA erzeugt oxidativen Stress im 3D-Kultursystem. Proben aus Explantaten und Sphäroiden wurden mit dem Katalase-Test untersucht (n=6). AAA erzeugt einen signifikanten Anstieg der Katalase-Aktivität ab div6. Proben mit H_2O_2 Behandlung dienen als Positivkontrolle. +/- SD, (*p < 0.1, ***p < 0.001).

zeigt, dass eine gewisse Basisaktivität in der Kontrolle vorhanden ist, die über den betrachteten Zeitraum (Tag 4 – 10) gleich bleibt. Diese Basisaktivität resultiert aus den Nebenprodukten des Stoffwechsels (H_2O_2), die von der Katalase abgebaut werden. Die AAA-behandelten Proben zeigten zu Anfang (div4) kaum einen Effekt hinsichtlich der Katalase-Aktivität. Dieser Zustand änderte sich jedoch ab Kulturtag 6. Nun zeigten die AAA-behandelten Proben mehr als dreimal so viel Katalase-Aktivität, wie in den Kontrollen. Am Kulturtag 8 erreichte der Anstieg der Katalase einen maximalen Wert, der auch am 10. Tag *in vitro* gehalten wurde. In der Positivkontrolle wurde durch Zugabe von 0,5 mM H_2O_2 für 18 h ebenfalls ein deutlicher Anstieg an Katalase erzeugt.

Zur Verdeutlichung der Daten aus Abbildung 30 wurden die Expression des Katalase-Tests näher untersucht. Sphäroide wurden mit unterschiedlichen AAA-Konzentrationen behandelt und entsprechende Proben zu div6 und 10 für molekularbiologische Untersuchungen genommen. Die Auswertung aus zwei Ansätzen (n=2) zeigte, dass AAA in der Lage war, die Katalase-Expression zu stimulieren (Abbildung 31). Hierbei scheint der Effekt von AAA zu div6 größer zu

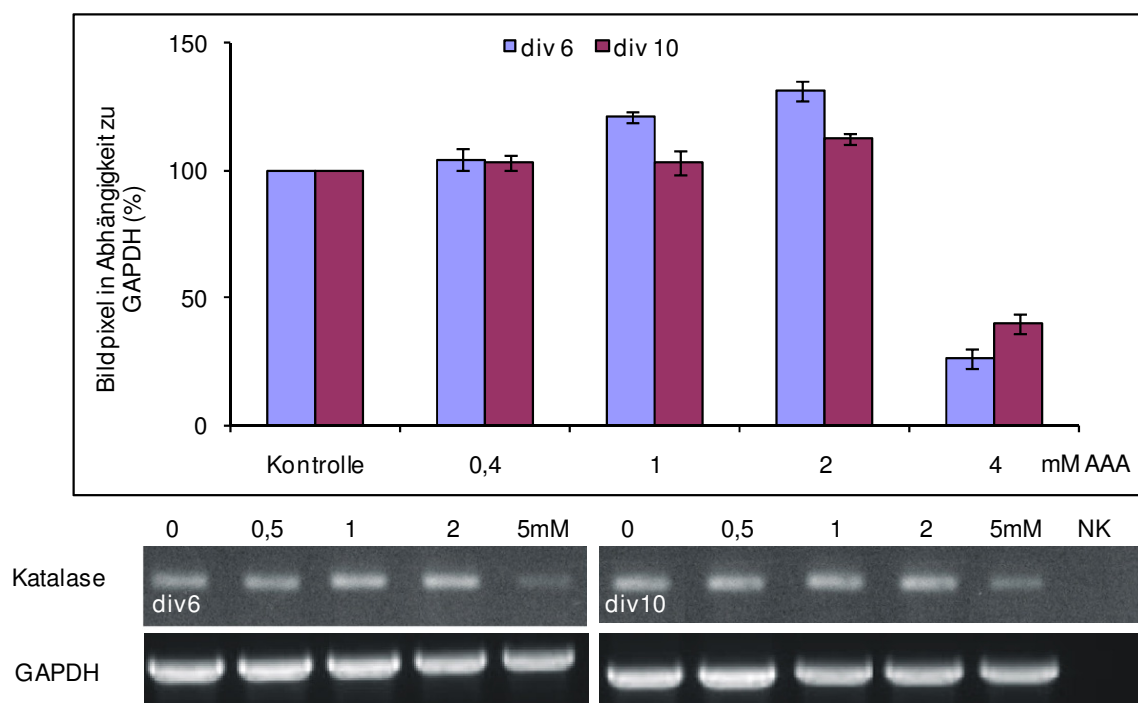


Abbildung 31. AAA steigert die Katalase-Expression (RT-PCR) mit steigender AAA-Konzentration im Rosettensphäroid am Tag 6 und 10. Beachte, dass die Expression zu div6 stärker auf AAA reagiert als zu div10 (n=2); +/-SD. 4 mM AAA zeigt eine starke Reduktion der Katalase-Expression. NK bezeichnet die Negativkontrolle.

sein als zu div10. Vermutlich waren die meisten Müllerzellen zu div10 bereits abgestorben, sodass nur wenige Zellen im Explantat (Müllerzellen) eine gesteigerte Katalase-Expression aufweisen können.

4.2.6.1 Auch hohe Ascorbat-Konzentrationen erzeugen oxidativen Stress

Diese Arbeit zeigt, dass hohe Ascorbat-Konzentrationen in der Lage waren, neurotoxische Eigenschaften auszuüben. Zwei Studien zeigen, dass hohe Konzentrationen an Ascorbat die Konzentration an H_2O_2 steigen lässt (231-232). Dies kann in Neuronen zu oxidativem Stress und so zum Absterben der Neuronen führen. Müllerzellen scheinen gegen diese Art von Stress resistent zu sein.

In dieser Arbeit wurde der Katalase-Test etabliert und zum Nachweis vom oxidativen Stress eingesetzt. Dieser Test wurde eingesetzt, um zu überprüfen, ob 2 mM Ascorbat in der Lage war, oxidativen Stress in retinalem Gewebe zu erzeugen. Die Sphäroide wurden mit unterschiedlichen Ascorbat-Konzentrationen am Tag 8 *in vitro* behandelt (0,5, 1, 2 mM). Für diese Studie wurden 3 unabhängige Proben jeweils 3-mal dem Katalase-Test unterzogen (n=9). Als Positivkontrolle wurden Sphäroide für 18 h mit 0,5 mM H_2O_2 behandelt und wie die

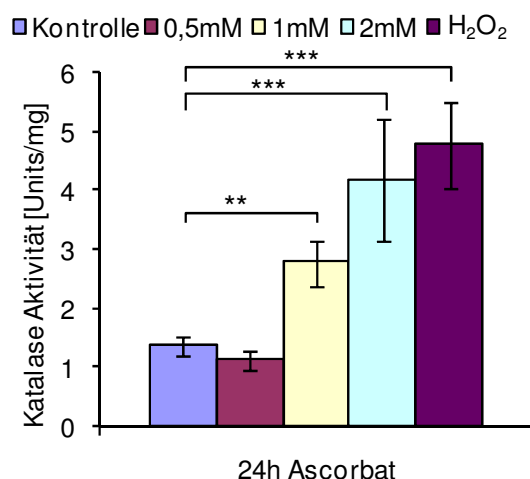


Abbildung 32. Ascorbat erzeugt in erhöhter Dosis oxidativen Stress im Rosettensphäroid. Sphäroide wurden an div8 mit unterschiedlichen Ascorbat-Konzentrationen behandelt und dem Katalase-Test unterzogen. Beachte: Erst ab 1 mM Ascorbat zeigt sich eine Wirkung. Positivkontrolle: H_2O_2 -Behandlung für 18 h. (n=9) +/- SD, (**p<0.01, ***p<0.001).

anderen Ascorbat-Ansätze dem Katalase-Test unterzogen. In Abbildung 32 sind die Ergebnisse dieser Studie graphisch dargestellt. Alle Ascorbat-Ansätze zeigen niedrigere Katalase-Aktivitäten als die Positivkontrolle. Dennoch ist ein deutlicher Zusammenhang zwischen Katalase- und Ascorbat-Konzentrationen zu erkennen. Die in dieser Arbeit verwendete Ascorbat-Konzentration (2 mM) erzeugt 4 mal höhere Katalase-Aktivität als in der Kontrolle. Somit liegt die Vermutung nahe, dass hohe Ascorbat-Konzentrationen die

Entstehung von oxidativem Stress unterstützen.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass Ascorbat eine neurotoxische Eigenschaft, bei höheren Konzentrationen, entwickelt. Der Katalase-Test gibt eindeutige Hinweise darauf, dass Ascorbat oxidativen Stress erzeugt, der speziell in Neuronen zum Zelltod führt. Interessant ist, dass Neuronen der Gewebeaußenseite stärker betroffen waren als Neuronen im Zentrum. Im Gegensatz zum AAA-induzierten oxidativen Stress in Müllerzellen, bleibt eine gewisse Struktur im Zentrum des Gewebes unter Ascorbat erhalten. Müllerzellen waren allerdings nicht in der Lage, die Struktur des Gewebes alleine aufrecht zu erhalten. Müllerzellen bilden keine Zellfortsätze zu abgestorbenen Zellen. Somit ziehen die Müllerzellen alle Fortsätze aus der „äußeren Region“, dort wo die Neuronen abgestorben waren, zurück. Durch fortschreitende Ascorbat-Behandlung war es möglich, Müllerzell-Sphäroide ohne Neuronen zu erstellen. Hierbei zeigen die Müllerzellen keine Transdifferenzierung zu Neuronen, was bei der herkömmlichen Müllerzell-Sphäroidproduktion aus Müllerzell-Monolayern der Fall ist.

Auch wenn Ascorbat wie AAA oxidativen Stress erzeugt, ist dieser Stress auf zwei unterschiedliche Zellpopulationen begrenzt. Während AAA ein gliaspezifisches Toxin ist, sind im retinale Gewebe nur Müllerzellen resistent gegen hohe Ascorbat-Konzentrationen.

4.2.7 GFAP-Expression wird durch AAA ausgelöst

Neben den morphologischen Veränderungen der Müllerzellen gilt die gesteigerte Expression von GFAP als Nachweis für eine Gliose (12, 56-58). Die Proben aus Abschnitt 4.2.6 wurden auf die Expression von GFAP untersucht. In Müllerzellen wird GFAP nur unter Stressbedingungen einer Gliose exprimiert (siehe Einleitung). Die Abbildung 33 zeigt eindeutig, dass die GFAP-Expression unter AAA-Einfluss induziert und mit steigender AAA-Konzentration erhöht wird. Allerdings wurde bei 4 mM AAA keine GFAP-Expression beobachtet. Offenbar waren bei dieser hohen gliatoxischen Konzentration alle Müllerzellen bereits abgestorben, wie es schon Abbildung 24 vermuten läßt.

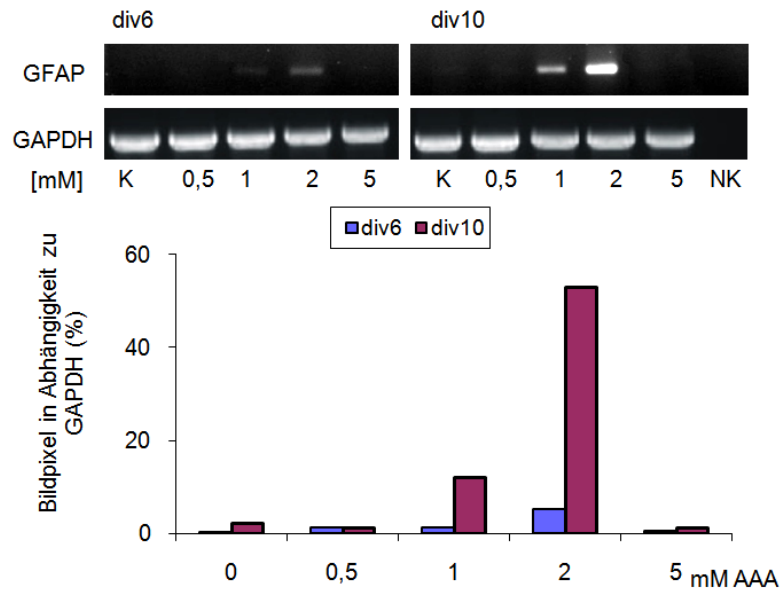


Abbildung 33. AAA induziert eine GFAP Expression. Sphäroide wurden mit verschiedenen AAA-Konzentrationen behandelt und div6 und 10 mittels RT-PCR auf das Expressionsverhalten von GFAP untersucht. Die Genexpression wurde mittels ImageJ graphisch dargestellt. Beachte das GFAP nur in Abhängigkeit von der AAA-Behandlung induziert wird. K: Kontrolle; NK: Negativkontrolle.

Zusammenfassend erzeugt AAA in Müllerzellen oxidativen Stress, der zum gliotischen Anschwellen des Zellkörpers im Bereich der INL und im weiteren Verlauf der Behandlung zum Absterben der Müllerzellen führt. Einen weiteren Beweis für die Gliose liefert die gesteigerte bzw. induzierte Expression von GFAP. Durch das Anschwellen werden die umliegenden Neuronen zur Seite gedrückt, was in der DAPI-Färbung als 'Riss' in der INL gedeutet werden kann. Durch das Anschwellen werden speziell die apikalen Zellfortsätze der Müllerzellen zurückgezogen, wodurch die OPL bzw. ONL als abgegrenzte Schicht verloren geht. Die Wirkung von AAA auf die retinale Struktur ist konzentrationsabhängig, wobei 1 mM für weitere Studien als optimale Konzentration gewählt wurde. Interessant ist, dass AAA auf spätere Stadien einen stärkeren Einfluss hat, als auf frühere Stadien. Offenbar ist das Entwicklungsstadium der Müllerzellen von entscheidender Bedeutung für die toxische Wirkung von AAA.

Im weiteren Verlauf wird die Wirkung von AAA auf die Expression von Zytokinen und ihren Rezeptoren untersucht, bzw. inwieweit exogene Faktoren der AAA-Gliose entgegenwirken.

4.2.8 Veränderung der Expressionsmuster relevanter Gene durch Amino adipat (AAA)

4.2.8.1 Reaktion einer reinen Müllerzell-Population auf Amino adipat

Die bisherigen Experimente zeigen eindeutig, dass die Morphologie der Müllerzellen unter dem Einfluss von AAA leidet und damit auch die gesamte Struktur der Retina verloren geht. Die Frage stellt sich nun, wie reine Müllerzellen auf AAA reagieren. Zu diesem Zweck wurden entsprechende Monolayer erstellt und am 8. Tag *in vitro* mit 2 mM Ascorbat behandelt. Die hieraus resultierenden Müllerzell-Monolayer wurden mit 1 bis 4 mM AAA behandelt. Abbildung 34 zeigt die Ergebnisse vor und 24 h nach AAA-Behandlung. Hierbei ist zu erwähnen, dass die Bildpaare (vor und nach

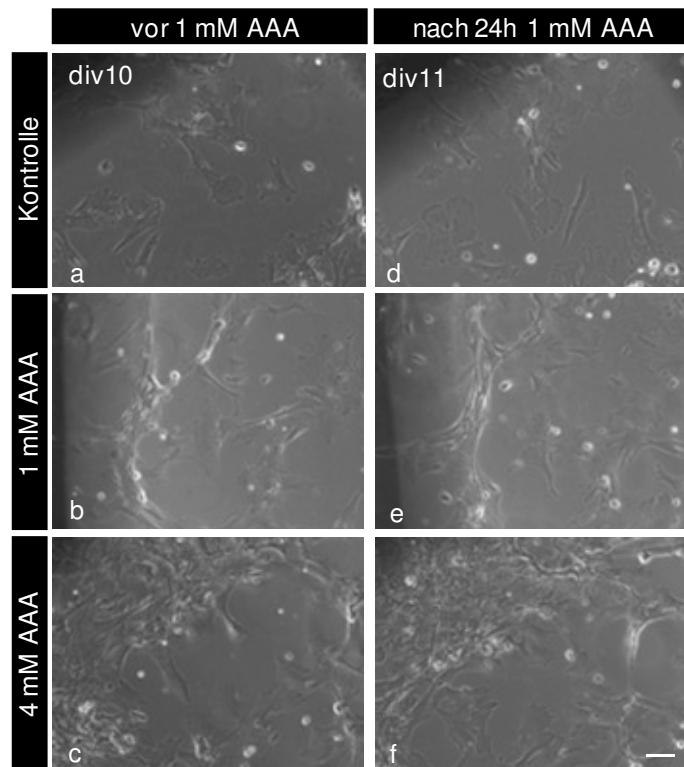


Abbildung 34. AAA zeigt keinen toxischen Einfluss auf reine Müllerzell-Monolayer, welche mit verschiedenen AAA-Konzentrationen (1 und 4 mM AAA) für 24 Stunden behandelt wurden. Müllerzell-Monolayer zu div10 (a-c) wurden mit AAA behandelt und dasselbe Areal zu div11 dokumentiert (d-f). Vergleiche die Müllerzell-Morphologie vor und nach 4 mM AAA (e und f). Maßstab: 50 μ m.

AAA) immer denselben Bereich des Monolayer zeigen. Überraschenderweise zeigte AAA im Monolayer keinen Einfluss auf reine Müllerzellen-Populationen, dies war selbst bei einer hohen toxischen AAA-Konzentration von 4 mM der Fall. Dieser Effekt könnte im Zusammenhang mit dem Verlust der Glutaminsynthetase-Expression in Abwesenheit von Photorezeptoren und der Rückentwicklung der Müllerzellen zu einem Vorläuferstatus stehen.

4.2.9 Veränderte Expression von Wachstumsfaktoren unter dem Einfluss von Aminoacidipat (AAA)

Die Müllerzellen dienen den Neuronen als Ressource für verschiedenste neurotrophe Signale (24). In den vorangegangenen Abschnitten wurde die Expression der Wachstumsfaktoren (BDNF, GDNF und PEDF) in Müllerzellen gezeigt (Gliederungspunkt 4.1.5). Diese Wachstumsfaktoren sind in der Lage, eine neurotrophe Wirkung auf die umliegenden Neuronen auszuüben. Eine Schädigung der Müllerzellen kann die Signale im gesamten retinalen Gewebe stören. Müllerzell-Gliose ist unter anderem eine Folge von oxidativem Stress (233-235). Mit dem Müllerzell-Toxin Aminoacidipat ist es möglich, speziell in den Müllerzellen einen gliotischen oxidativen Stress zu erzeugen (48). Hiermit ist ein Modellsystem gegeben, mit dem das Expressionsverhalten des retinalen Gewebes untersucht werden kann. Reine Müllerzellen entwickeln sich zu Müllerzell-Vorläufern ohne GS-Expression zurück. Diese Vorläufer sind resistent gegen hohe Dosen an AAA (4 mM). In diesem Zusammenhang wurde es nun möglich, die Reaktion der Wachstumsfaktor-Expression in Anwesenheit von Neuronen zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurde eine Expressionsstudie an AAA-behandelten Explantaten durchgeführt. Die Explantate wurden verschiedenen AAA-Konzentrationen (0,5, 1, 2, und 5 mM AAA) für 6 und 10 Tage *in vitro* ausgesetzt. Untersucht wurde die Genexpression von GDNF und seinen Rezeptoren (GFR α 1 und GFR α 2), sowie GFR α 4, BDNF, TrkB und PEDF. Der Rezeptor für PEDF ist bislang nicht eindeutig identifiziert. In Abbildung 35 ist das Expressionsverhalten von GDNF und den GFL's dargestellt. Die Daten aus der Gelelektrophorese wurden mit ImageJ ausgewertet und die Banden-Intensität graphisch dargestellt (GAPDH-Kontrolle = 100%). Mit steigender AAA-Konzentration verringerte sich die Expression von allen untersuchten Genen. Dabei war aber auffällig, dass die Expression von GDNF und seinem direkten Rezeptor GFR α 1 deutlich sensibler auf die verschiedenen AAA-Konzentrationen reagierte, als GFR α 2 und GFR α 4.

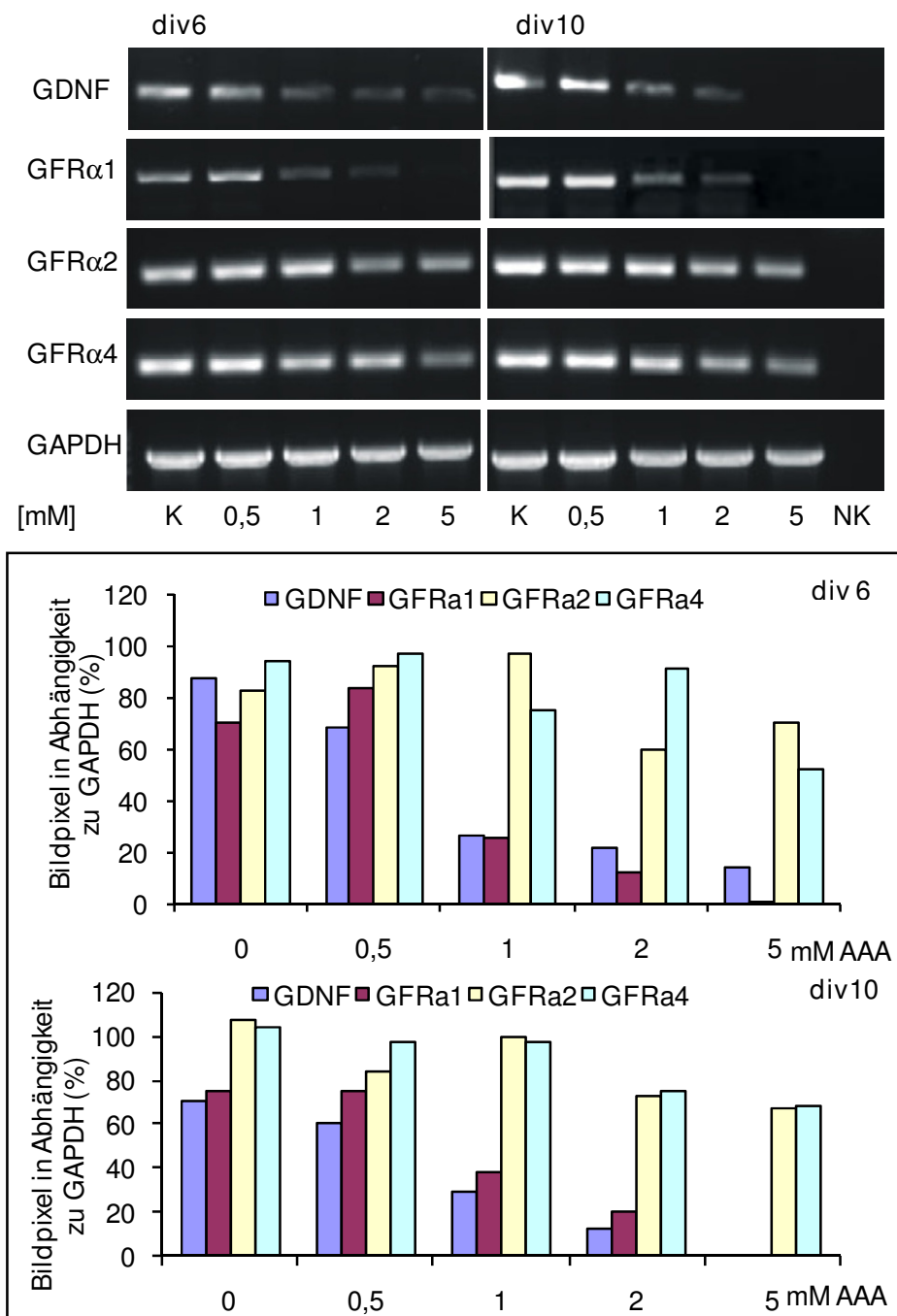


Abbildung 35. AAA-Dosisabhängigkeit der GDNF- und GFRα1-4-Expressionen. Sphäroide wurden mit verschiedenen AAA-Konzentrationen behandelt und div6 und 10 mittels RT-PCR auf das Expressionsverhalten von GDNF und den Rezeptoren GFRα1–4 untersucht. Die Genexpression wurde mittels ImageJ graphisch dargestellt. Vergleiche hierzu die stark geminderte Expression von GDNF und GFRα1 zu GFRα2 und 4 in Abhängigkeit zur AAA-Konzentration. K: Kontrolle; NK: Negativkontrolle.

Bei BDNF, TrkB und PEDF (Abbildung 36) war zunächst eine ähnliche Reduktion der Expression zu sehen, wie beim GDNF-System. Die Expression von BDNF verringert sich mit steigender AAA-Konzentration leicht, vergleichbar mit GFRα2

und GFR α 4. Der Rezeptor von BDNF reagierte wesentlich stärker auf AAA als BDNF. TrkB wird, wie PEDF, *in vivo* relativ spät exprimiert. *In vitro* ist TrkB wesentlich früher vorhanden, während PEDF in etwa gleich spät wie *in vivo* exprimiert wurde. Am Tag 6 *in vitro* war die Expression von TrkB schon bei 1 mM

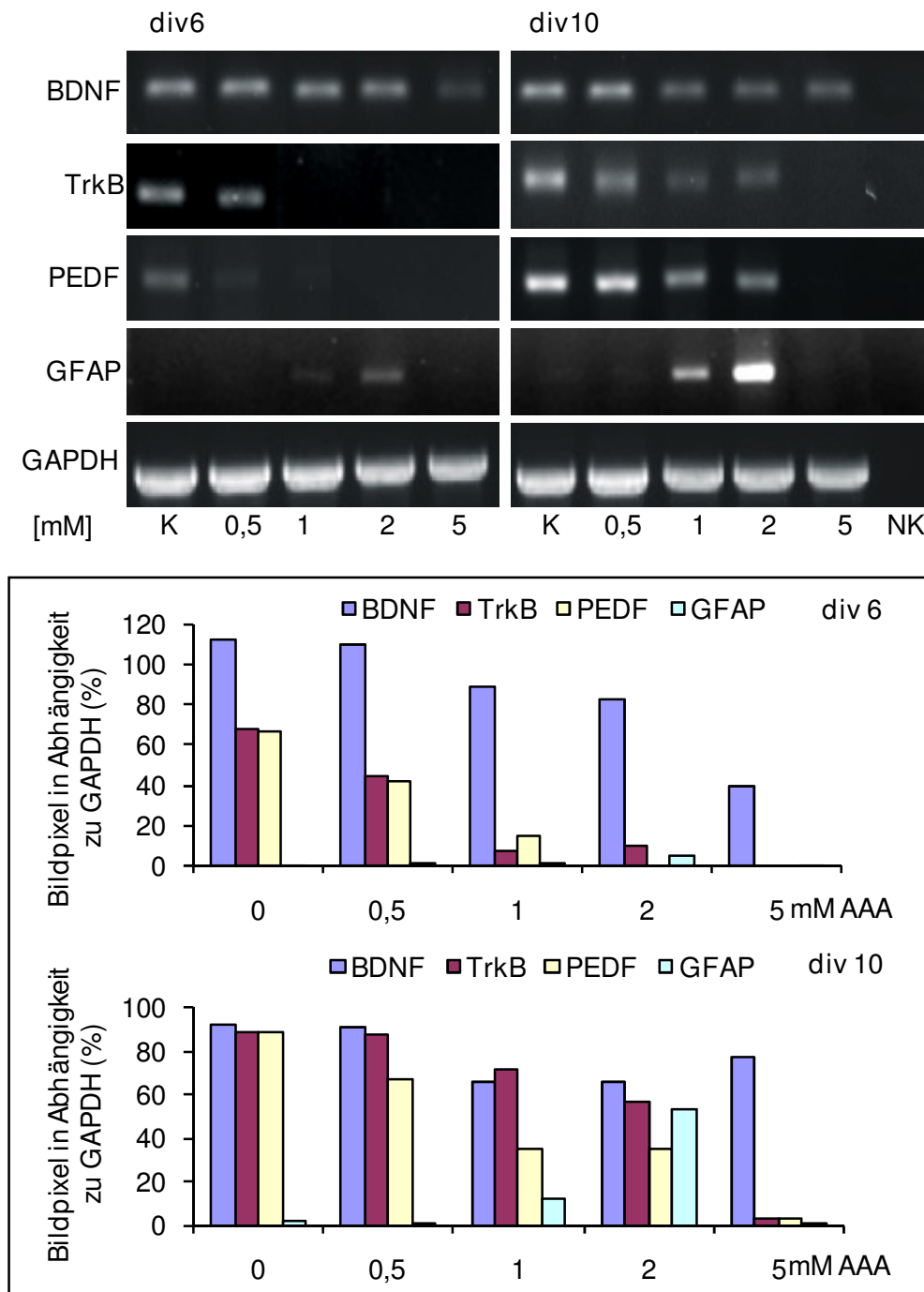


Abbildung 36. AAA-Dosisabhängigkeit der BDNF-, PEDF- und TrkB-Expressionen. Sphäroide wurden mit verschiedenen AAA-Konzentrationen behandelt und div6 und 10 mittels RT-PCR auf das Expressionsverhalten untersucht. Die Genexpression wurde mittels ImageJ graphisch dargestellt. Beachte die starke Reaktion der TrkB- und PEDF- Expression auf AAA. K: Kontrolle; NK: Negativkontrolle.

AAA verschwunden, während sie am Tag 10 *in vitro* auch bis 2 mM AAA vorhanden war. Ein ähnliches Bild bot sich bei PEDF. Offenbar sind Gene, deren Expression soeben erst *in vitro* begonnen haben, wesentlich stärker betroffen, als Gene, die schon vor der Präparation eine stabile Expression aufweisen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die PEDF-Expression am stärksten von allen Genen auf AAA reagiert. GDNF, GFR α 1 und TrkB weisen ebenfalls eine deutliche Reduktion auf. Alle anderen Gene besitzen eine relativ stabile Expression bis 5 mM AAA. Von den untersuchten Signalwegen für BDNF, GDNF und PEDF ist entweder die Expression des Rezeptors (GFR α 1 und TrkB) oder die Expression des Wachstumsfaktors (GDNF und PEDF) selbst stark von dem AAA-Einfluss betroffen. Alle untersuchten Signalwege werden durch AAA im retinalen Gewebe beeinträchtigt.

4.3 Kann eine Gliose durch Wachstumsfaktoren abgewendet werden?

Um eine Aussage über die Wirkung von Zytokinen auf ein Stress-System, wie dem AAA-Gliosemodell zu treffen, ist es erforderlich die Wirkung von relevanten Zytokinen unter normalen Kulturbedingungen zu studieren. Im Rahmen dieser Studie wurden zwei Diplomarbeiten angefertigt, die sich mit dieser Frage beschäftigen. Im Folgenden wird deswegen nur die Wirkung von GDNF dargestellt und in der Diskussion mit den Ergebnissen der Diplomarbeiten für BDNF und PEDF verglichen. Der zweite Hauptpunkt beschäftigt sich mit der Frage wie Zytokine bzw. AAA auf das Expressionsmuster relevanter Genen wirken. Die Ergebnisse dieser Studien dienen als Grundlage für die Zytokin-Behandlung im AAA-Gliosemodell.

4.3.1 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Entwicklung der Retina im Explantatsystem

Wachstumsfaktoren stellen wichtige Signale dar, welche zelltypspezifisch über Zellüberleben, Proliferation, Differenzierung etc. von Zellen bestimmen können. Gerade bei Krankheiten und Schäden der Retina rücken BDNF, GDNF und PEDF immer wieder in den Mittelpunkt der Forschung. Im Folgenden wird die Auswirkung von GDNF auf die retinale Entwicklung im Explantatsystem studiert.

Die Wirkung von BDNF und PEDF auf das Explantatsystem waren Bestandteil von zwei Diplomarbeiten, welche die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen (siehe Einleitung 1.6.1 und 1.6.2).

4.3.1.1 *Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)* beschleunigt die Entwicklung von Stäbchen, aber nicht von Zapfen

GDNF gewinnt immer mehr an Attraktivität für die Behandlung verschiedener degenerativer Krankheiten, wie Parkinson, Alzheimer und Hirschsprung (77, 236-238). Auch bei der Behandlung von Retina-degenerativen Krankheiten, wie Retinitis pigmentosa kann GDNF eine Rolle spielen. Unter dem Einfluss von GDNF wird die Degeneration von Photorezeptoren im Retinitis Pigmentosa-Rattenmodell verzögert (239).

Aufbauend auf vorangegangenen Arbeiten mit GDNF-behandelten Sphäroiden (151) wird hier zuerst die Entwicklung der Photorezeptoren unter GDNF-Einfluss betrachtet. Im Sphäroid-System steigert GDNF die Anzahl an Stäbchen-Photorezeptoren. Um die Wirkung von GDNF im Explantatsystem vergleichen zu können, wurden Retina-Explantate mit GDNF (50 ng/ml) behandelt. Entsprechende Kryoschnitte wurden gegen Glutaminsynthetase (GS) und

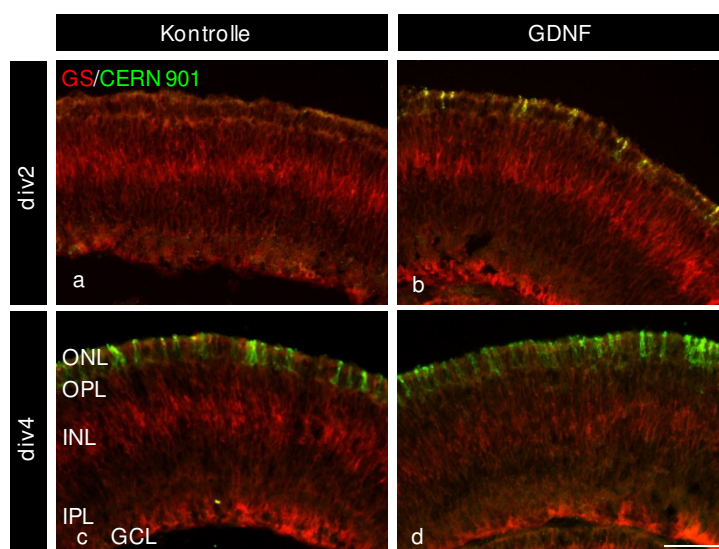


Abbildung 37. GDNF beschleunigt die Entwicklung von Stäbchen *in vitro*. Explantate wurden mit GDNF (50 ng/ml) behandelt. Kryoschnitte von div2 und 4 wurden gegen CERN 901 (grün) und GS (rot) gefärbt. Beachte, dass die Stäbchen-Förderung auch zu div4 noch zu erkennen ist. Maßstab: 50 μ m.

Stäbchen-Photorezeptoren (CERN 901) gefärbt (Abbildung 37). Die Entwicklung der ersten Rhodopsin-Expression in Photorezeptoren beginnt nach Tag 2 *in vitro*. Die Kontrolle zeigte am Tag 2 *in vitro* noch keine Rhodopsin⁺-Zellen in der ONL, während sich in den mit GDNF-behandelten Explantaten bereits erste CERN 901⁺-Zellen

differenziert haben. Bei Betrachtung späterer Kulturtage verschwand der GDNF-Effekt auf die Stäbchen-Photorezeptoren. Bereits am Tag 4 hatte die Kontrolle den Vorsprung der GDNF-behandelten Explantate fast vollständig aufgeholt. Eine tatsächliche Vermehrung der Stäbchen-Photorezeptoren wurde ab Tag 4 nicht festgestellt. Die Entwicklung der Müllerzellen (rot in Abbildung 37) war im Vergleich zur Kontrolle und GDNF-Behandlung unauffällig.

In Abbildung 38 wird der Frage nachgegangen, inwieweit Zapfen-Photorezeptoren auf GDNF (50 ng/ml) reagieren. Gezeigt sind Kryoschnitte, die gegen Zapfen-Photorezeptoren (CERN 906) und Amakrinzellen (Pax6) an frühen Entwicklungszeitpunkten der Photorezeptoren *in vitro* (Tage 2-6) gefärbt wurden. Am Tag 2 *in vitro* waren in der Kontrolle und in den GDNF-behandelten Explantaten keine Opsin⁺-Zapfen vorhanden. Erst am Tag 4 *in vitro* waren kleine Opsin⁺-Punkte an dem äußeren Rand der ONL bzw. den Photorezeptoren zu erkennen. Zwischen Kontrolle und GDNF-Behandlung war bis Tag 6 *in vitro* kein Unterschied ersichtlich. Die Zapfen-Entwicklung blieb durch die GDNF-Einwirkung unangetastet.

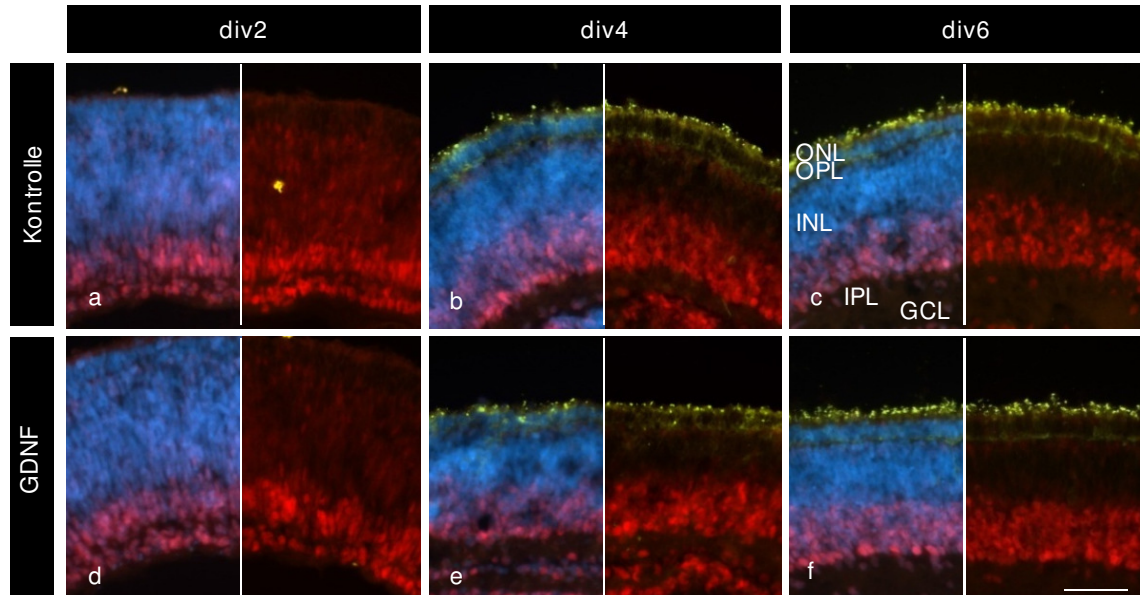


Abbildung 38. GDNF hat keine Auswirkung auf die IPL- und Zapfen-Entwicklung im Explantat. Explantate wurden mit 50 ng/ml GDNF behandelt und Kryoschnitte zu div3, 4 und 6 gegen Pax6 (rot) und Zapfen (CERN 906; grün) gefärbt. Beachte, dass zwischen der Kontrolle und GDNF-behandelten Explantaten kein Unterschied in der Opsin-Expression und IPL-Entwicklung besteht. Kernfärbung DAPI in blau. Maßstab: 50 µm.

4.3.1.2 GDNF fördert nicht die IPL-Entwicklung

Neben der ONL- und Photorezeptor-Entwicklung ist die IPL-Entwicklung ein weiterer wichtiger Bereich der retinalen Entwicklung. Durch die Pax6-Färbung werden alle Amakrinzellen in der INL und GCL, inklusive der SACs (Typ I in der INL und Typ II in der GCL) angefärbt. Die IPL-Entwicklung beginnt am Tag 2 *in vitro*. Die Abbildung 38 zeigt, dass sowohl in der frühen Phase der IPL-Entwicklung, als auch in der späten IPL-Entwicklung kein Unterschied zwischen GDNF-Behandlung und Kontrolle zu erkennen war. In beiden Fällen war die Aufspaltung der IPL gleich weit fortgeschritten. Auch die Anzahl der Pax6⁺-Zellen war bei beiden Ansätzen vergleichbar. GDNF zeigte einen fördernden Effekt speziell auf die Differenzierung der Stäbchen-Photorezeptoren, allerdings nicht auf die Zapfen-Entwicklung. Auch die Entwicklung und Morphologie der Müllerzellen blieb unauffällig. Ebenso schien sich die IPL unbeeinflusst von GDNF im Explantat zu entwickeln.

Zusammenfassend zeigt GDNF, im Vergleich zu den Ergebnissen der Diplomarbeiten, eine fördernde Wirkung speziell auf Stäbchen, aber nicht auf die Zapfen. PEDF scheint die Entwicklung von Zapfen auf Kosten der Stäbchen zu fördern. Beide Faktoren beschleunigen somit nur einen der zwei Photorezeptortypen. Neben der klassischen Wirkung von BDNF auf das Ganglienzell-Überleben, zeigt BDNF auch eine stimulierende Wirkung auf die Photorezeptor-Entwicklung, allerdings nur in Kombination mit Forskolin. Forskolin stimuliert die Expression des BDNF-Rezeptors TrkB und sorgt für eine gesteigerte Wirkung des exogenen BDNFs. Bei Betrachtung anderer Bereiche der Retina zeigen GDNF und PEDF keine fördernde oder blockierende Wirkung auf die IPL-, INL- und Müllerzell-Entwicklung. BDNF dagegen beschleunigt neben der Photorezeptor-Entwicklung auch die IPL- Bildung und die Migration der Horizontalzellen.

Alle verwendeten Wachstumsfaktoren zeigen eine zelltypspezifische Wirkung auf die Entwicklung der Retina. In verschiedenen Arbeitsgruppen wird sogar vermutet, dass die Zytokine indirekt über Müllerzellen auf die Neuronen wirken. Der Hauptbestandteil des nächsten Kapitels beschäftigt sich mit der Frage, inwieweit Müllerzellen auf exogene Faktoren.

4.3.1.3 GDNF und BDNF stimulieren die mRNA-Expression von Glutaminsynthetase (GS) in reine Müllerzell-Populationen

Als Marker für die späteren Entwicklungsphasen der Müllerzelle gilt die Expression von Glutaminsynthetase (GS). In reinen Müllerzellen ist diese Expression auf ein Minimum reduziert, sodass sie nicht mit Antikörpern nachgewiesen werden kann. Durch den Kontakt zu Photorezeptoren zeigen die Müllerzellen jedoch eine deutliche immunhistochemische GS-Färbung. Die Müllerzellen sind somit auf den direkten Kontakt zu Photorezeptoren angewiesen, um zu GS-exprimierenden Zellen zu differenzieren.

Um den Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Differenzierung der Müllerzellen

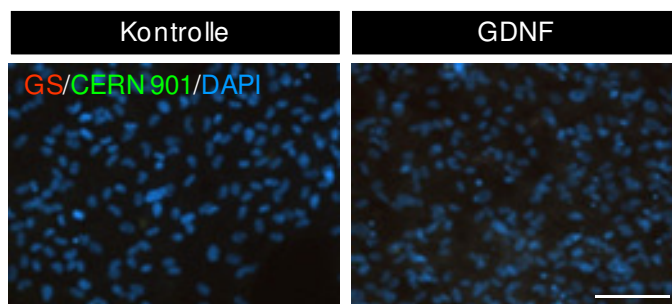


Abbildung 39. Keine Veränderung der GS-Immunfärbung durch Zugabe von Wachstumsfaktoren. Müllerzell-Monolayer wurden mit verschiedenen Wachstums-faktoren für 48 h behandelt und gegen GS und CERN 901 mit DAPI als Kernfärbung (blau) gefärbt. In allen Behandlungsformen wurde keine GS- und CERN 901-Färbung beobachtet. Maßstab: 50 μ m.

zu untersuchen, wurden reine Müllerzell-Monolayer erstellt und mit GDNF (50 ng/ml), PEDF (50 ng/ml), EGF (50 ng/ml), FGF (20 ng/ml) und BDNF (50 ng/ml) in Kombination mit Forskolin (5 μ M) für 24 Stunden behandelt. Die Monolayer wurden anschließend geerntet und für immunhistochemische

Färbungen sowie Expressionsstudien vorbereitet.

Abbildung 39 zeigt Monolayer gefärbt gegen Müllerzellen (GS) und Stäbchen-Photorezeptoren (CERN 901). Das Fehlen von CERN 901⁺-Zellen soll die Abwesenheit von Photorezeptoren verdeutlichen. In allen Ansätzen wurde die GS-Expression durch Wachstumsfaktoren nicht so gesteigert, dass sie in der Immunfärbung sichtbar würde. Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass Müllerzellen eine Basis-Expression an GS aufweisen, die nicht durch Antikörper anfärbbar ist. Bei Betrachtung der Expressionen (Abbildung 40) fällt auf, dass GDNF sowie BDNF mit Forskolin die Expression von GS im Vergleich zur Kontrolle gesteigert haben.

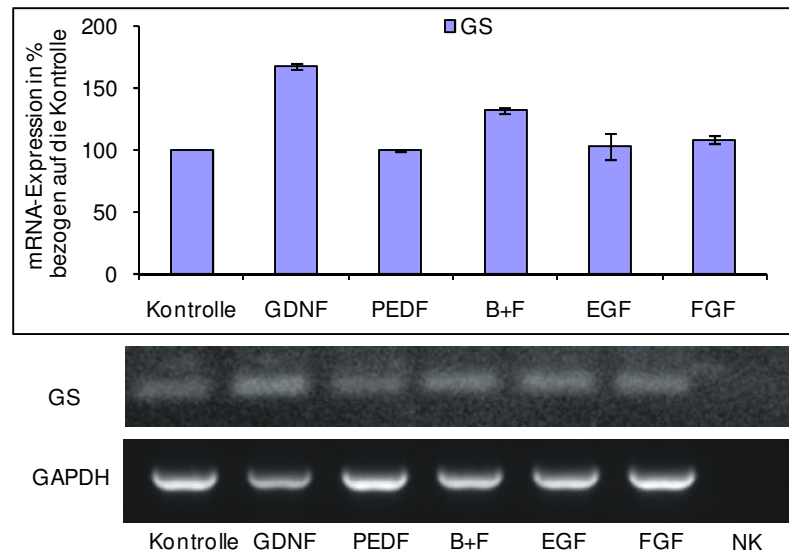


Abbildung 40. GS-Expressionsmuster in reinen Müllerzell-Kulturen unter Behandlung mit verschiedenen Wachstumsfaktoren. Reine Müllerzellkulturen wurden mit entsprechenden Faktoren behandelt und mittels RT-PCR auf entsprechende Gene untersucht. Die GS-Expression wurde mittels ImageJ graphisch dargestellt. Nur GDNF und BDNF/Forskolin steigern die GS-Expression. (n=2) +/- SD. NK: Negativkontrolle; B+F: BDNF & Forskolin.

4.3.1.4 Beeinflussen Wachstumsfaktoren die Genexpression in Müllerzellen?

Die verwendeten Wachstumsfaktoren werden immer wieder im Zusammenhang mit Müllerzellen betrachtet (173, 229, 240-242). GS ist nur eines der Gene, welches in Müllerzellen exprimiert und durch Wachstumsfaktoren beeinflusst werden kann. Dieselben Proben aus dem letzten Abschnitt wurden auf die Expression von Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren untersucht (GDNF und seine Rezeptoren, BDNF, TrkB und PEDF). Hierbei war von besonderem Interesse, inwieweit die Expression von Wachstumsfaktoren auf exogene Wachstumsfaktoren (GDNF, BDNF/Forskolin, PEDF, EGF oder FGF) reagiert. Für diese Studie wurde eine separate Behandlung mit Forskolin (5 μ M Forskolin) erstellt, daher besitzt Forskolin seine eigene Kontrolle. Forskolin erhöhte die TrkB-Expression über einen gesteigerten cAMP-Spiegel. Bislang wurde nicht untersucht, ob Forskolin denselben Effekt auf die TrkB-Expression auch in Müllerzellen hat. Zudem ist der erhöhte cAMP-Spiegel nicht nur für die Expression von TrkB wichtig, denn unter Umständen reagieren in reinen Müllerzellen auch andere Gene auf exogenes Forskolin. Somit wird durch die Forskolin-Behandlung zumindest eine gesteigerte Expression von TrkB erwartet. Die Ergebnisse aus dieser umfangreichen Expressionsstudie sind nachfolgend in Abbildung 41-

Abbildung 43 dargestellt (n=2). Die Gel-Daten wurden mit ImageJ grafisch ausgewertet. Hierbei wurden die Banden der behandelten Proben auf die jeweiligen GAPDH-Banden (Beispiel in Abbildung 43) normiert und auf die Kontrolle bezogen dargestellt (Kontrolle = 100%). Für die Statistik wurden 2

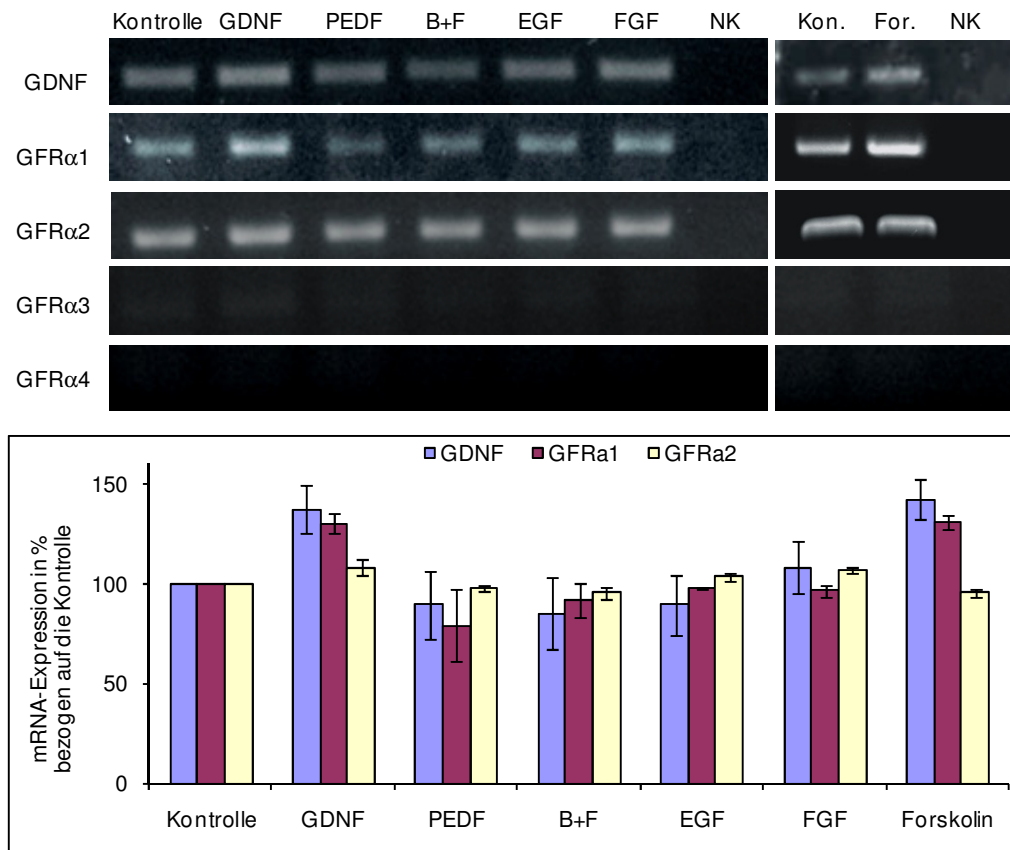


Abbildung 41. Expressionsmuster von GDNF und von GFRα1-4 in reinen Müllerzell-Kulturen, unter Behandlung mit verschiedenen Wachstumsfaktoren. Reine Müllerzell-Kulturen wurden mit entsprechenden Faktoren behandelt und mittels RT-PCR auf die Expression von GDNF und GFLs untersucht. Die Genexpression wurde mittels ImageJ graphisch dargestellt. Beachte, dass die Expression von GDNF und GFRα1 durch GDNF und Forskolin gesteigert wird. Auf die graphische Darstellung von GFRα3 und 4 wurde, wegen der fehlenden Expression, verzichtet. (n=2) +/- SD. NK: Negativkontrolle; B+F: BDNF und Forskolin; Kon.: Kontrolle; For.: Forskolin.

unabhängige Ansätze ausgewertet (n=2). Bei der Betrachtung des GDNF-Systems (GDNF und GFRα1-4) wurde deutlich, dass GFRα3 und GFRα4 in reinen Müllerzellen nicht exprimiert und ihre Expression durch keinen Wachstumsfaktor stimuliert wurde (siehe auch Expression in Müllerzellen Abbildung 21). Daher wurde im Diagramm in Abbildung 41 auf die Darstellung von GFRα3 und GFRα4 verzichtet. Die Expression von GDNF und GFRα1 wurde durch exogenes GDNF und Forskolin stimuliert. Mit PEDF, BDNF mit Forskolin- und EGF-Behandlung erschienen GDNF und die Expression von GFRα1 etwas reduziert (nicht

signifikant!). GDNF ist zum Teil auch ein Ligand von GFR α 2. Allerdings zeigte GFR α 2 in keiner Behandlung eine Abweichung zur unbehandelten Kontrolle.

In Abbildung 42 ist die Auswertung der Expression von PEDF, BDNF und seinem Rezeptor TrkB dargestellt. Die Behandlung mit Forskolin steigert die Expression von BDNF und seinem Rezeptor TrkB. Wird BDNF in Kombination mit Forskolin verwendet, stieg nur die Expression des Rezeptors TrkB. Der Überschuss an exogenem BDNF scheint eine Blockierung des stimulierenden Forskolin-Signals auf die BDNF-Expression zu haben. Die PEDF-Expression wurde nur durch exogenes PEDF gesteigert. Bei den anderen Behandlungsformen war nur eine leichte Schwankung in der PEDF-Expression zu beobachten.

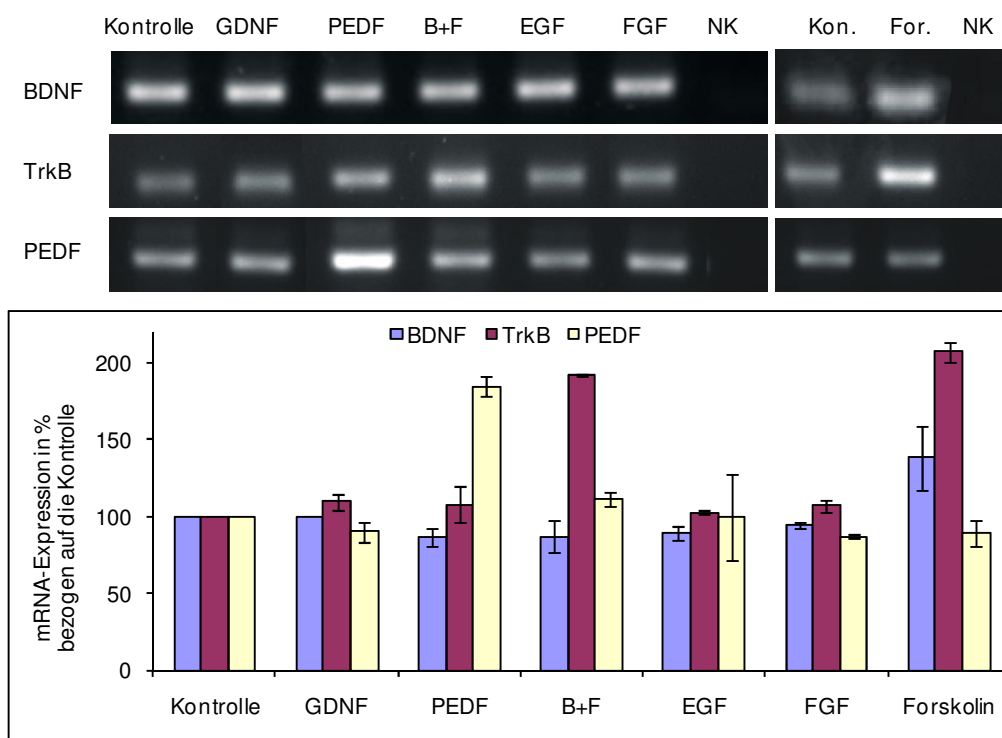


Abbildung 42. Expressionsmuster von BDNF, PEDF und TrkB in reinen Müllerzellkulturen, unter Behandlung mit verschiedenen Wachstumsfaktoren. Reine Müllerzell-Kulturen wurden mit entsprechenden Faktoren behandelt und mittels RT-PCR auf die Expression benannter Gene untersucht. Die Genexpression wurde mit Hilfe von ImageJ graphisch dargestellt. Beachte, dass die Expression von TrkB durch BDNF/Forskolin und Forskolin gesteigert wird. PEDF steigert seine eigene Expression. (n=2) +/- SD. NK: Negativkontrolle; B+F: BDNF und Forskolin; Kon.: Kontrolle; For.: Forskolin.

Abbildung 43 untersucht die Expression weiterer Gene (Vimentin und Katalase) unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren. Hier ist ein Beispiel für die GAPDH-Expression in dieser Studie dargestellt. Vimentin ist ein Marker für Müllerzell-Vorläufer. Katalase ist in allen Zelltypen zu finden und wird unter dem Einfluss vom oxidativem Stress stimuliert. Die Expressionsdaten zeigten, dass in Kultur

kein Stress durch exogene Zytokine erzeugt wurde. Vimentin war in allen Behandlungsformen unbeeinflusst exprimiert.

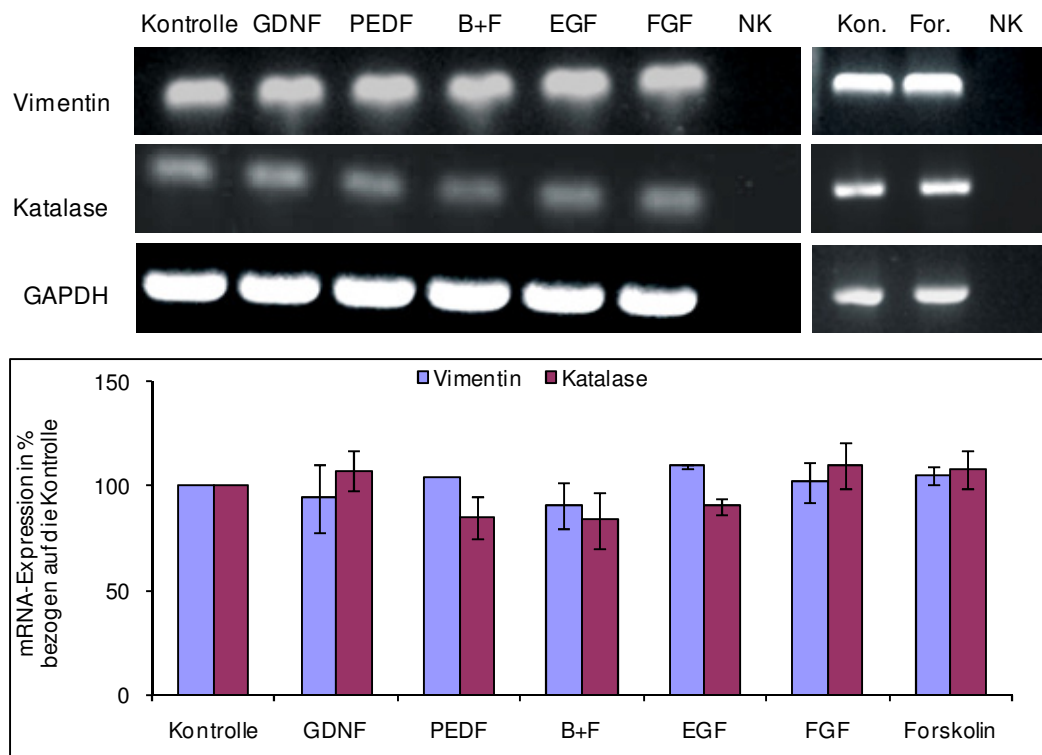


Abbildung 43. Kein Wachstumsfaktor zeigt einen Einfluss auf die Vimentin- und Katalase-Expression. Reine Müllerzell-Kulturen wurden mit entsprechenden Faktoren behandelt und mittels RT-PCR auf die Expression benannter Gene untersucht. Die Genexpression wurde mittels ImageJ graphisch dargestellt. (n=2) +/- SD. NK: Negativkontrolle; B+F: BDNF und Forskolin; Kon.: Kontrolle; For.: Forskolin.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass Müllerzellen auf exogene Wachstumsfaktoren reagieren können und dass die Differenzierung zu GS⁺-Müllerzellen durch GDNF und BDNF/Forskolin stimuliert wird. Desweiteren reagieren Müllerzellen auf exogene Faktoren und verändern ihr Expressionsmuster. GDNF und PEDF stimulieren jeweils ihre eigene Expression in Müllerzellen. Forskolin stimuliert zum einen die Expression von TrkB und zum anderen aber auch die Expression von GDNF, GFR α 1 und BDNF. Diese Studie zeigt, dass Müllerzellen eine Ressource für Wachstumsfaktoren darstellen können, die durch exogene Faktoren spezifisch weiter stimuliert werden können.

4.3.2 Wachstumsfaktoren und ihre Wirkung auf die AAA-Gliose

Es wurde gezeigt, dass Müllerzellen in der Lage sind, auf Wachstumsfaktoren zu reagieren (Gliederungspunkt 4.3.1.3). Zudem wurde bei exogen zugeführtem GDNF und PEDF deren eigene Expression in Müllerzellen stimuliert. Desweiteren wurde gezeigt, dass die Expressionen von Wachstumsfaktoren durch Zugabe des Müllerzell-Toxins AAA reguliert werden. Es stellt sich nun die Frage, ob es möglich ist, durch exogene Wachstumsfaktoren im AAA-Gliosemodell eine deutliche Verbesserung der Gliose hervorzurufen.

4.3.2.1 BDNF und GDNF schützen nicht gegen die Gliose

Im voran gegangenen Abschnitt wurde die Expression von BDNF, GDNF, PEDF und ihren Rezeptoren nachgewiesen. Unter Umständen bieten diese Faktoren auch einen Schutz gegen die AAA-Gliose. Um dies weiter zu untersuchen, wurden Explantate bis Tag 2 bzw. 6 *in vitro* kultiviert und mit 1 mM AAA und/oder 50 ng/ml BDNF bzw. 50 ng/ml GDNF behandelt. Die Abbildung 44 zeigt inwieweit BDNF oder GDNF die toxische Wirkung von AAA beeinflussen. Kryoschnitte vom Tag 6 *in vitro* wurden gegen Müllerzellen (GS) und Stäbchen-Photorezeptoren (CERN

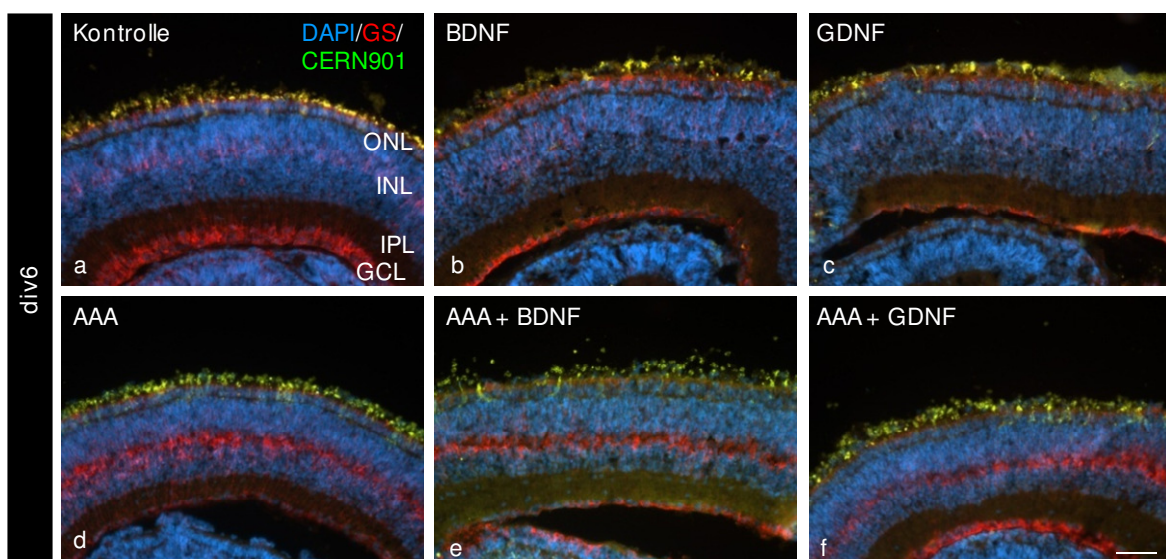


Abbildung 44. BDNF und GDNF zeigen keinen Einfluss auf die gliotoxischen Wirkungen von AAA. Explantate wurden mit Wachstumsfaktoren (10 ng/ml BDNF und 50 ng/ml GDNF) und/oder 1 mM AAA behandelt. Kryoschnitte von div6 wurden gegen GS (rot) und Stäbchen (CERN 901; grün) gefärbt. Beachte, dass AAA-Explantate in allen Behandlungsformen (+ BDNF oder + GDNF) einen ‚INL-Riss‘ zeigen.

901) gefärbt. Es zeigten sich in allen Doppelbehandlungen die gleichen Befunde, wie in den AAA-Behandlungen, alleine auf die INL und das Anschwellen der Müllerzellen. Somit haben BDNF und GDNF in dieser Kombination keinen Einfluss auf das Anschwellen und die Bildung des 'INL-Risses'. Auch der Verlust der Strukturen in der ONL durch AAA wurde mit exogenen BDNF oder GDNF nicht

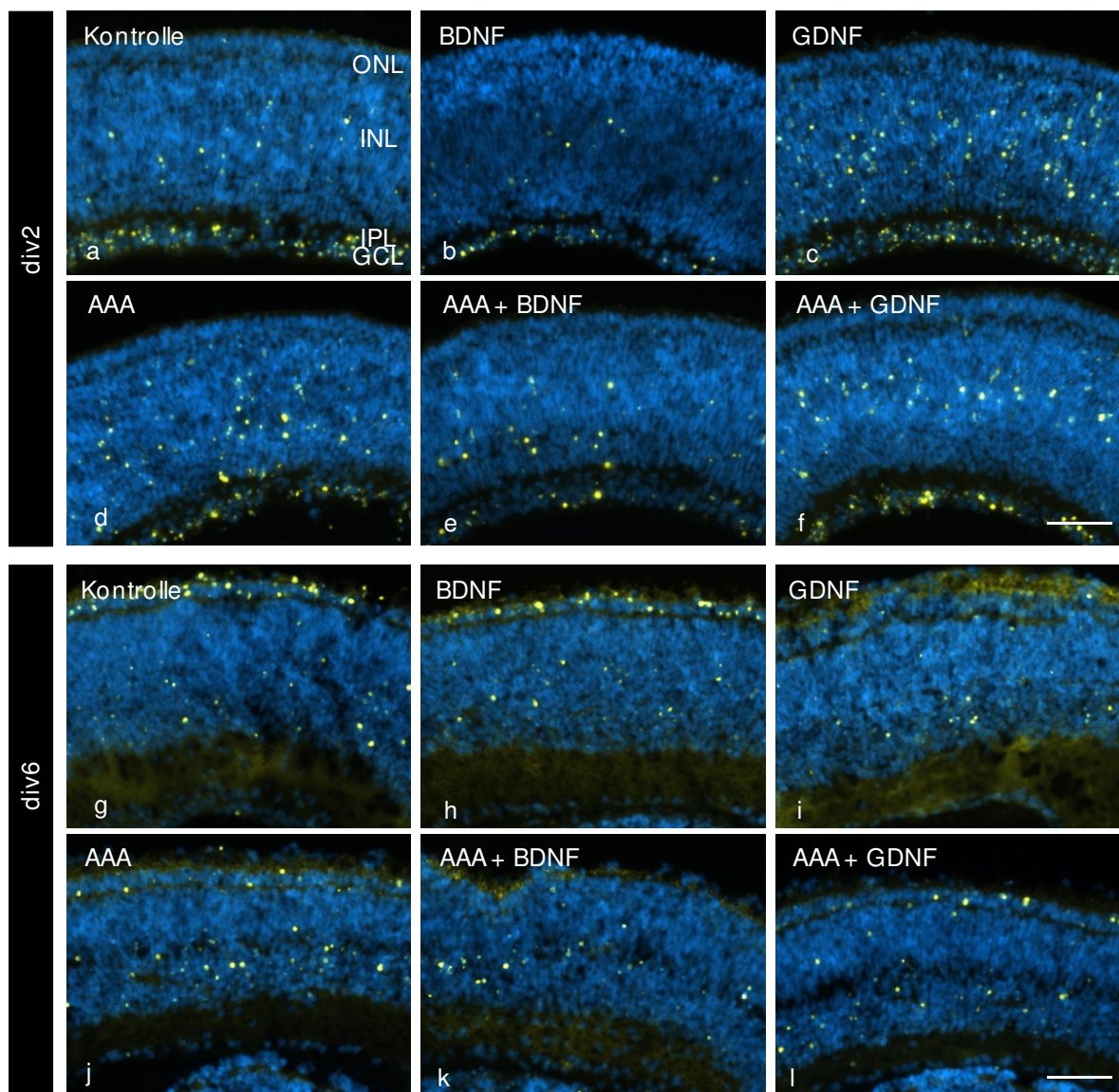


Abbildung 45. BDNF oder GDNF haben keinen Einfluss auf retinale Apoptosen bei AAA-Behandlung. Explantate wurden mit 10 ng/ml BDNF, 50 ng/ml GDNF und/oder 1 mM AAA behandelt. Kryoschnitte von div2 und 6 wurden mit dem TUNEL-Test gefärbt. BDNF reduziert den Zelltod in der GCL (e). GDNF verringert das Absterben der Photorezeptoren an div6 (i). In allen AAA-behandelten Explantaten ist eine Steigerung der TUNEL⁺-Zellen in Höhe des 'INL-Risses' zu sehen. Kernfärbung DAPI in blau. Maßstab: 50 µm.

verändert. Die Abbildung 45 zeigt die gleiche Behandlung mit BDNF und GDNF in Kombination mit 1 mM AAA hinsichtlich der TUNEL-Färbung am Tag 2 und 6 *in vitro*. BDNF zeigte auch unter dem Einfluss von AAA eine deutliche Reduktion der

TUNEL⁺-Zellen in der GCL am Tag 2 *in vitro*. GDNF hingegen hatte keinen Einfluss auf die Apoptose in der GCL oder der INL. Auch in diesem Experiment zeigte AAA keinen Einfluss auf das Absterben der Ganglienzellen. Die Zellkörper der Müllerzellen begannen am Tag 6 *in vitro* anzuschwellen und drückten dabei die Neuronen in der INL zur Seite, wodurch sich der 'INL-Riss' bildete. Darüber hinaus zeigte die TUNEL-Färbung bei allen AAA-behandelten Ansätzen deutlich mehr TUNEL⁺-Zellen in der Nähe des 'Risses'. Am Tag 6 *in vitro* wurden die Photorezeptoren im Explantatsystem reduziert. Dieses Phänomen zeigte sich in der TUNEL-Färbung zu Tag 6 *in vitro* immer wieder. Im Abschnitt 4.2.3 wurde bereits beschrieben, dass AAA keinen Einfluss auf den Zelltod in der ONL hat. Auch BDNF zeigte bei AAA-Behandlung keinen Effekt auf den Zelltod in der ONL. Die GDNF-Behandlung zeigte allerdings eine Reduktion der TUNEL⁺-Photorezeptoren in der ONL. GDNF hatte aber keinen Einfluss auf die Entwicklung des 'INL-Risses' oder auf das Absterben der Müllerzellen in der INL. Beide Faktoren sind keine *rescue*-Faktoren für die Müllerzell-Gliose.

4.3.2.2 PEDF reduziert die AAA-Gliose in Müllerzellen

In der bisherigen Beschreibung wurde ein Wachstumsfaktor ausgelassen, auf den nun genauer eingegangen wird. Interessanterweise zeigte PEDF (50 ng/mL) einen deutlichen Effekt auf die AAA-Behandlung. In Abbildung 46 wurden Kryoschnitte von Tag 3 und 8 *in vitro* mit dem Zellkernfarbstoff DAPI gefärbt. Die Explantate wurden neben der Kontrolle mit 50 ng/ml PEDF und/oder 1 mM AAA behandelt. PEDF selbst hatte keinen Effekt auf die Entwicklung der OPL und IPL. AAA lässt die INL aufreißen und bewirkt eine diffuse Anordnung der Photorezeptoren in der ONL. Wurden allerdings Explantate mit AAA in Kombination mit PEDF behandelt, reduziert sich das 'Aufreißen' der INL und die ONL blieb noch als abgetrennte Zellschicht erkennbar. Somit wirkt PEDF der Wirkung von AAA im Explantatsystem entgegen.

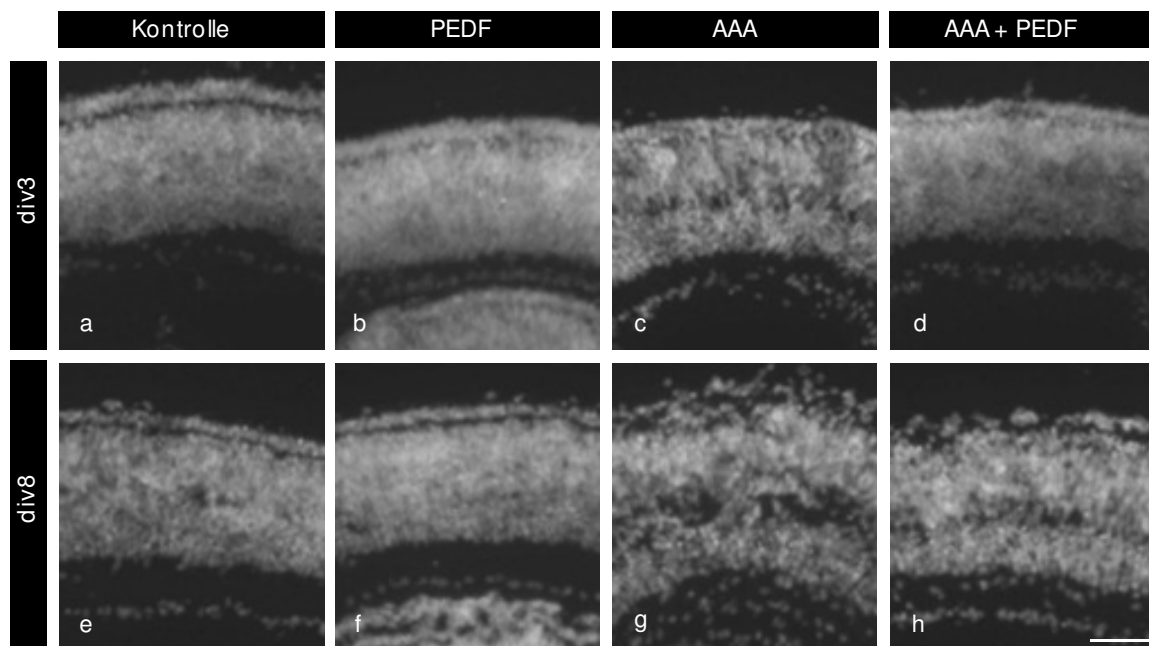


Abbildung 46. PEDF verringert die Auswirkungen von AAA auf die INL im Explantat. Explantate wurden mit 50 ng/ml PEDF und/oder 1 mM AAA behandelt. Krioschnitte von div3 (a-d) und 8 (e-g) wurden mit DAPI gefärbt. Beachte, dass PEDF die Bildung des ‚INL-Riss‘ durch AAA (c, g) reduziert (d, h). Maßstab: 50 μ m.

Wurden dieselben Krioschnitte gegen Müllerzellen (GS) und Stäbchen-Photorezeptoren (CERN 901) gefärbt, zeigte sich zunächst der bereits beschriebene Effekt von PEDF auf die Stäbchen-Entwicklung in frühen Entwicklungsstadien. PEDF verzögerte die Entwicklung der Stäbchen-Photorezeptoren, was in Abbildung 47 am Tag 3 und am Tag 8 *in vitro* gezeigt wird. Desweiteren fällt die gesteigerte Expression von Rhodopsin in den Photorezeptoren auf. Diese Steigerung wurde auch durch Zugabe von PEDF kaum beeinflusst. 1 mM AAA zeigte am Tag 3 *in vitro* kaum einen erkennbaren Effekt, dennoch war die CERN 901-Färbung gegen Stäbchen-Photorezeptoren deutlich stärker als in der Kontrolle. Dies hängt mit fehlenden Segmenten der Photorezeptoren und der gestörten Auslagerung von Rhodopsin in die Segmente zusammen. Unter Umständen stimuliert eine Beeinträchtigung der Müllerzellen die Differenzierung der Photorezeptoren. Die Struktur der Müllerzellen war in der Kontrolle und in den mit PEDF-behandelten Explantaten langgestreckt, während die Müllerzell-Fortsätze unter AAA-Einfluss deutlich kürzer und die Zellen insgesamt angeschwollen waren. Durch PEDF wurde zum einen die Schwellung reduziert, und zum anderen erschienen die Müllerzell-Fortsätze deutlich gestreckter als bei AAA-behandelten Explantaten.

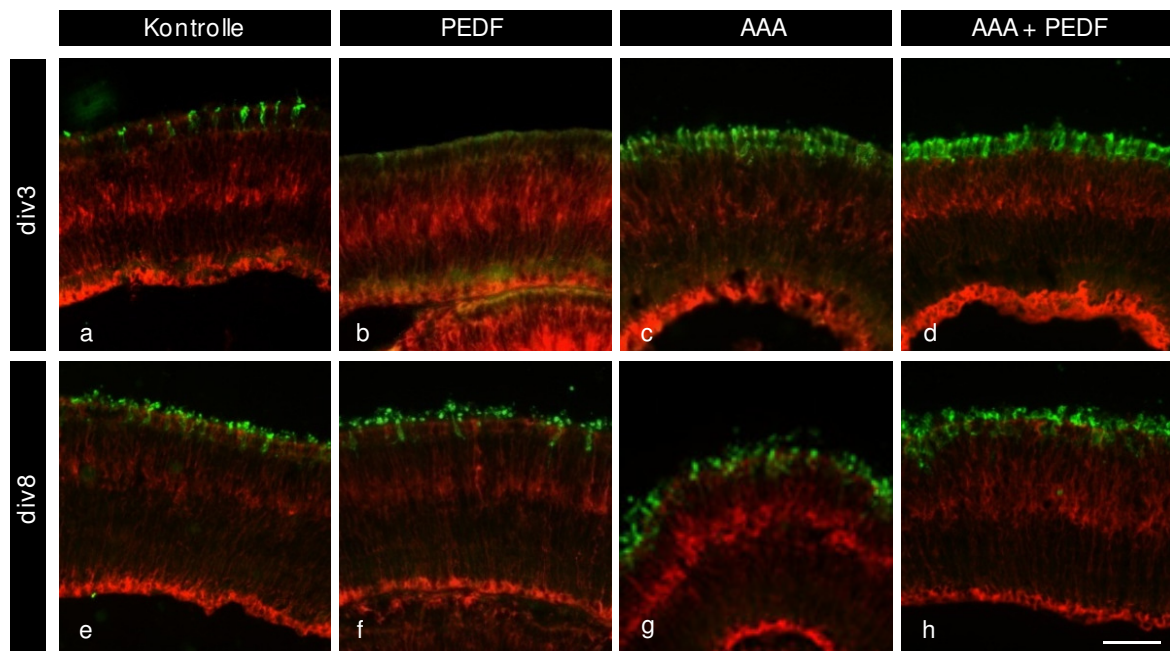


Abbildung 47. PEDF reduziert den AAA-Einfluss auf die Müllerzell- und ONL-Struktur. Explantate wurden mit 50 ng/ml PEDF und/oder 1 mM AAA behandelt. Krysoschnitte von div3 (a-d) und 8 (e-h) wurden gegen GS (rot) und Stäbchen (CERN 901; grün) gefärbt. Beachte den *rescue* der Müllerzell- und ONL-Struktur durch PEDF unter dem Einfluss von AAA (g, h). Maßstab: 50 μ m.

PEDF ist somit in der Lage, das gliotische Anschwellen der Müllerzellen zu reduzieren. Auch die Struktur der ONL die durch AAA-Behandlung gestörte wurde, erscheint unter zusätzlicher PEDF-Behandlung deutlicher organisiert. Müllerzellen scheinen somit in Anwesenheit von PEDF 1 mM AAA besser zu vertragen. Um

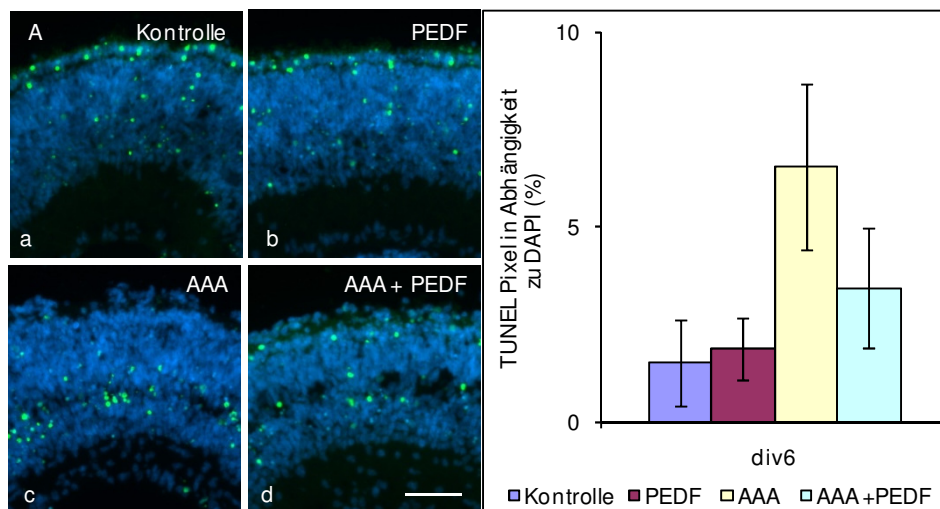


Abbildung 48. PEDF reduziert den AAA-induzierten Zelltot der Müllerzellen. Explantat-Krysoschnitte von div6 behandelt mit 50 ng/ml PEDF und/oder 1 mM AAA, gefärbt mit dem TUNEL-Test (A) und den Bereich der INL mit ImageJ statistisch ausgewertet (B). (n=15) \pm SD. Maßstab: 50 μ m.

dies eindeutig nachzuweisen, wurde der Zelltod in der INL mittels TUNEL-Test am Tag 6 überprüft (Abbildung 48) und per ImageJ mind. 15 Explantatschnitte statistisch ausgewertet. Zwischen Kontrolle und PEDF-Behandlung war kein Unterschied festzustellen; jedoch erhöhte AAA massiv die Anzahl an TUNEL⁺-Signalen. Dieser Anstieg weist auf das Absterben der Müllerzellen im 'INL-Riss' hin. Die zusätzliche Behandlung mit PEDF reduzierte diese TUNEL⁺-Signale signifikant. Selbiges Bild zeigte sich auch ganz deutlich in der Statistik. PEDF reduziert also die Folgen des AAA-`Stresses' um 50%.

4.3.2.3 PEDF wirkt dem Verlust der IPL-Subbanden durch AAA entgegen

Eine weitere wichtige Struktur der Retina ist die IP IPL und in ihr die Subbanden a und d, die schon bei geringen AAA-Konzentrationen nicht ausgebildet werden (18). Kryoschnitte vom Tag 3 und 6 *in vitro* wurden immunhistochemisch gegen Acetylcholinesterase-haltige Amakrinzellen (3D10) und gegen SACs (ChAT) gefärbt. Desweiteren wurden Kryoschnitte vom Tag 6 *in vitro* mit der Färbemethode nach Karnovsky-Roots gegen die AChE-Aktivität gefärbt (Abbildung 49). Während der frühen IPL-Entwicklung zeigte AAA kaum eine Auswirkung. Die IPL war in allen Ansätzen gleich weit entwickelt. Bei der Kontrolle und mit PEDF-behandelten Explantaten waren die Subbanden a und d deutlich am Tag 6 *in vitro* entwickelt. Auch in der Karnovsky-Roots-Färbung waren die Subbanden a und d deutlich nachweisbar. Diese Subbanden werden in der INL und GCL von den AChE⁺-Amakrinzellen flankiert. Unter dem Einfluss von AAA waren die Subbanden nur verkümmert an wenigen Stellen ausgebildet. Darüber hinaus war die Anzahl der SACs, im Vergleich zur Kontrolle, oder mit PEDF-behandelten Explantaten verringert. Die Karnovsky-Roots-Färbung zeigte keine AChE⁺-Subbanden in der INL, nur die AChE⁺-Amakrinzellen in der INL war zu erkennen. PEDF reduzierte die Auswirkungen von AAA auf die IPL erheblich. Deutlich waren die Subbanden a und d in der ChAT/3D19-Färbung zu erkennen. Auch die Anordnung der SACs war mehr mit der Kontrolle zu vergleichen, als nach AAA-Behandlung alleine. Dies wurde in der Karnovsky-Roots-Färbung bestätigt. Auch hier wurde der toxische Einfluss von AAA durch exogenes PEDF fast aufgehoben.

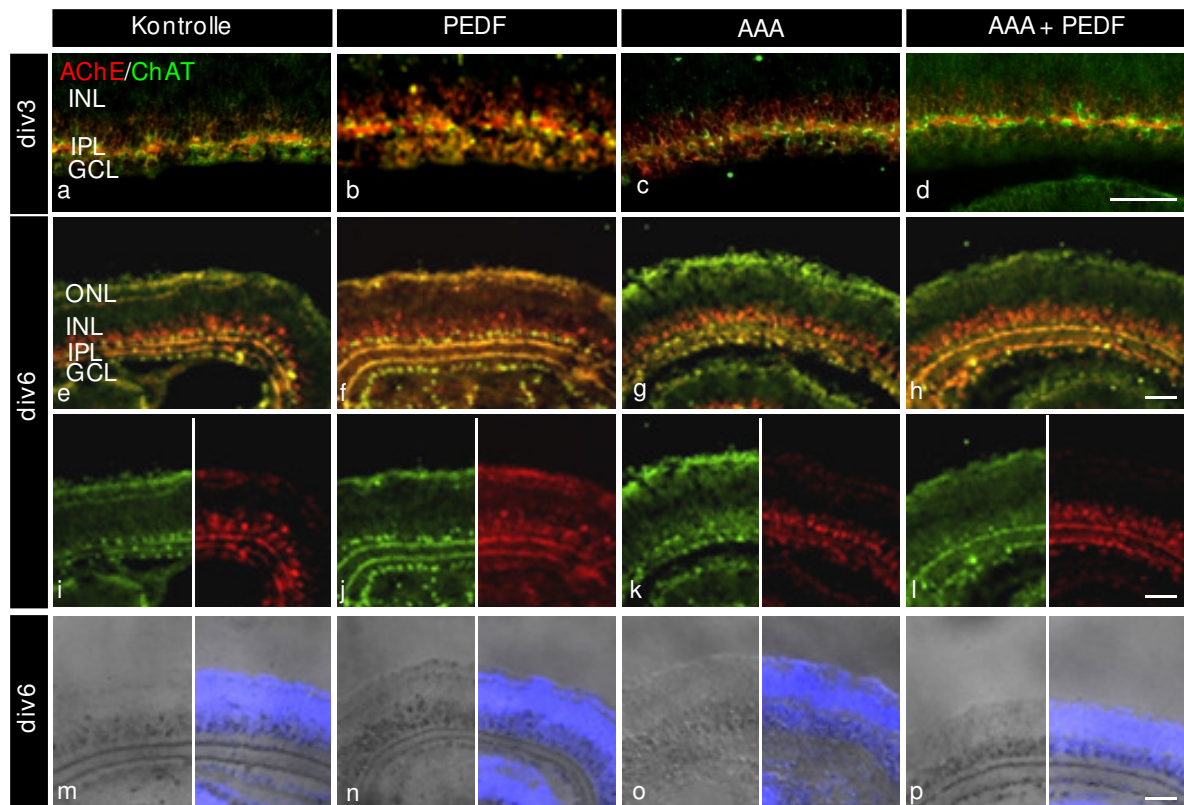


Abbildung 49. PEDF bewirkt einen *rescue* auf die IPL-Strukturen unter dem Einfluss von AAA. Explantate wurden mit 50 ng/ml PEDF und/oder 1 mM AAA behandelt. Kryoschnitte von div3 (a-d) und 6 (e-p) wurden zum einen gegen GS (rot) und zum anderen gegen Stäbchen (CERN 901; grün) gefärbt (a-i) und die AChE-Aktivität mit der Karnovsky-Roots Färbetechnik sichtbar gemacht (m-p). Die Bilder i-l zeigen die Einzelkanäle der überlagerten Bilder e-h. Beachte, dass die Subbanden unter AAA missgebildet sind (g, k, o) und PEDF einen *rescue* der IPL-Subbanden bewirkt (h, i, p). Maßstab: 50 μ m.

4.3.2.4 PEDF kann seine eigene Expression unter AAA-Einfluss nicht stimulieren

In den Expressionsstudien wurde durch zugefügtes PEDF die eigene PEDF-Expression in Müllerzellen gesteigert. Unter dem Einfluss von AAA wurde die Expression von PEDF schon bei 0,5 mM AAA beeinträchtigt (Gliederungspunkt 4.2.9). Im Folgenden wird die Expression von PEDF im Explantat unter dem Einfluss von 50 ng/ml PEDF und/oder 1 mM AAA untersucht. In Abbildung 50 wurden entsprechende Explantate bei Tag *in vitro* 4, 6 und 8 kultiviert (je n=2) und für die Expressionsstudie vorbereitet; die Gel-Daten wurden mit Hilfe von ImageJ ausgewertet und als Grafik dargestellt. Es zeigte sich, dass die PEDF-Expression *in vitro* erst ab Tag 6 beginnt. Daher war eine PEDF-Expression erst ab Tag 6 *in vitro* in der Kontrolle zu sehen. PEDF stimulierte/induzierte seine eigene

Expression, allerdings nicht am Tag 4 *in vitro*, sondern erst ab Tag 6 *in vitro*. Am Tag 8 *in vitro* zeigte auch die Kontrolle eine deutliche PEDF-Expression; und PEDF war auch hier in der Lage, seine eigene Expression zu erhöhen. Der Einfluss von AAA reduzierte die Expression von PEDF im Explantat. Am Tag 6 *in vitro* war in der Kontrolle nur eine schwache PEDF-Bande zu sehen, die unter AAA-Einfluss fast ganz fehlte. Wesentlich deutlicher war die Reduktion der PEDF-Expression am Tag 8 *in vitro*. Unter dem Einfluss von AAA war PEDF wieder nicht in der Lage, seine Expression zu stimulieren. AAA blockiert also die Expression von PEDF, auch wenn der stimulierende Faktor (PEDF) vorhanden war. Die PEDF-Expression unter AAA war mit der Einzelbehandlung mit AAA vergleichbar.

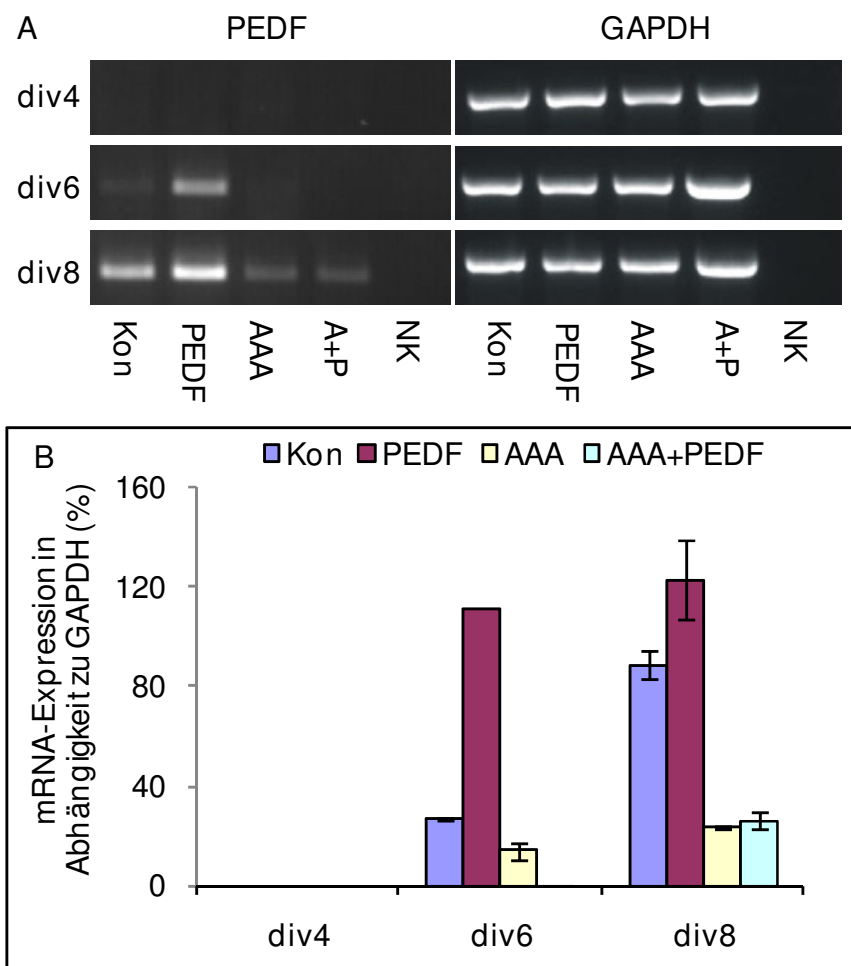


Abbildung 50. PEDF fördert seine eigene Expression, aber nicht unter dem Einfluss von AAA. A: Dargestellt ist die PEDF-Expression unter dem Einfluss von 50 ng/ml PEDF und/oder 1 mM AAA an div4, 6 und 8. B: Graphische Darstellung der PEDF- Expression aus A durch ImageJ. PEDF steigert seine eigene Expression. PEDF ist nicht in der Lage die Reduktion der PEDF-Expression durch AAA zu kompensieren. (n=2) +/-SD Kon.: Kontrolle; A+P: AAA + PEDF; NK: Negativkontrolle.

4.3.2.5 PEDF reduziert die AAA stimulierte GFAP-Expression im Explantat.

In Kapitel 4.2.7 wurde gezeigt, dass AAA die GFAP-Expression mit steigender AAA-Konzentration stimuliert. Die gesteigerte GFAP-Expression in Müllerzellen beweist, dass AAA eine Gliose erzeugt. Wenn die GFAP-Expression durch PEDF auch normalisiert wird, ist das ein weiterer eindeutiger Beweis, dass PEDF der Gliose entgegen wirkt. Zu diesem Zweck wurden die Proben aus Abschnitt 4.2.7 auf die GFAP-Expression untersucht. Abbildung 51 zeigt die GFAP-Expression zu (n=2) div6 und 8. Zu div6 war 1 mM AAA nicht in der Lage die GFAP-Expression zu stimulieren, dass gleiche Ergebnis wurde in Abschnitt 4.2.7 erzielt. Auch in den anderen Ansätzen am Tag 6 wurde keine GFAP-Expression gefunden. Am Tag 8

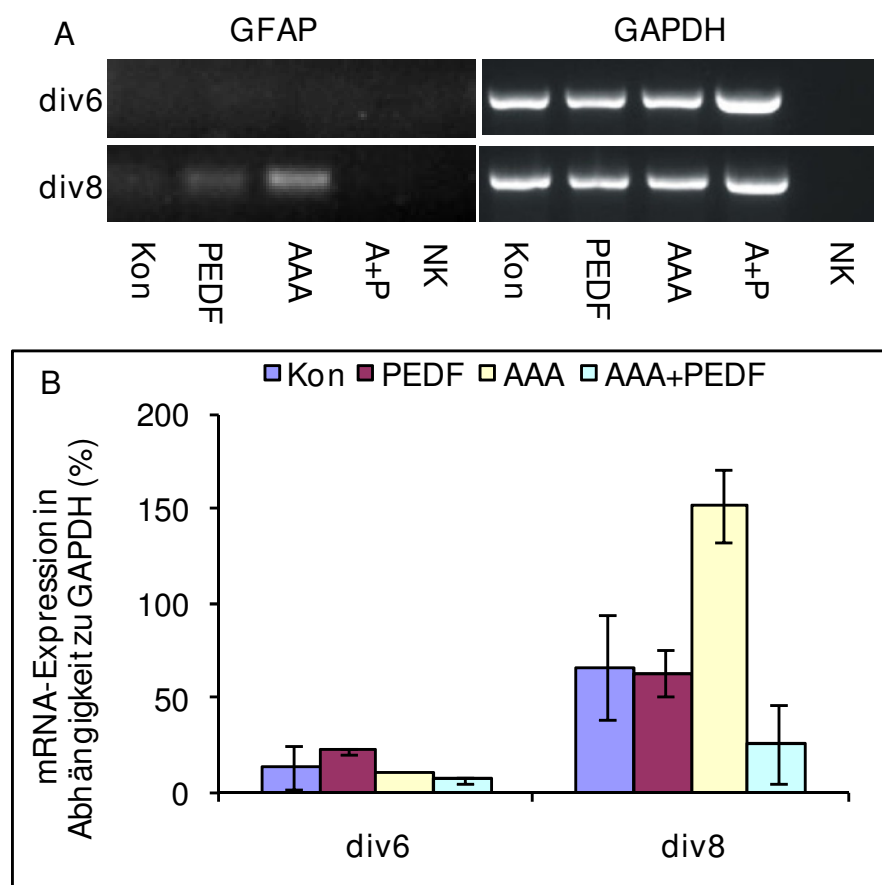


Abbildung 51. AAA-Stimulierte GFAP-Expression wird durch PEDF reduziert. A: Dargestellt ist die GFA-Expression unter dem Einfluss von 50 ng/ml PEDF und/oder 1 mM AAA an div6 und 8. B: Graphische Darstellung der GFAP- Expression aus A durch ImageJ. PEDF steigert seine eigene Expression. Beachte, das PEDF die AAA induzierte GFAP-Expression blockiert. (n=2) +/-SD Kon.: Kontrolle; A+P: AAA + PEDF; NK: Negativkontrolle.

in vitro ist deutlich die gesteigerte Expression von GFAP unter AAA-Einfluss zu *div8* zu erkennen. PEDF wirkt der toxischen Wirkung von AAA entgegen, sodass fast keine GFAP-Expression zu erkennen war. Die Einzelbehandlung mit PEDF zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die GFAP-Expression.

4.3.2.6 Auch bei späterer AAA-Behandlung reduziert PEDF die Gliose

In Abschnitt 4.2.4 wurde gezeigt, dass AAA eine weitaus größere Toxizität besitzt, wenn AAA zu einem späteren Zeitpunkt zugegeben wurde. Die Frage stellt sich, ob PEDF auch dabei in der Lage ist, die toxische Wirkung von AAA zu reduzieren. Um dies zu überprüfen, wurden Explantate bis Tag 6 *in vitro* nur mit PEDF ohne AAA behandelt. Ab Tag 6 *in vitro* wurde zu einem Teil der Explantate 1 mM AAA zugegeben und für 48 h weiter inkubiert. Die entsprechenden Kryoschnitte wurden gegen Müllerzellen (GS und Vimentin), Amakrinzellen (Pax6), Zapfen-Photorezeptoren (CERN 906) und filamentreichen Regionen (F11) immunhistochemisch gefärbt (Abbildung 52). In allen Färbungen waren PEDF-Behandlung und Kontrolle vergleichbar. AAA zeigte hier wieder eine deutliche Veränderung der Müllerzellenmorphologie. Die GS-Färbung war fast bis auf einen dünnen Streifen in der INL zurückgezogen. In der ONL und GCL waren nur noch Reste der GS-Färbung zu erkennen. Zwischen der IPL, GCL und ONL waren nur noch sehr dünne Zellfortsätze vorhanden, die mit der GS-Färbung kaum zu erkennen waren. PEDF verbesserte die Struktur der Müllerzellen erheblich. Deutlich waren Müllerzell-Fortsätze zu erkennen, die fast bis in die ONL und GCL reichen. Ein ähnliches Bild war auch in der Vimentin-Färbung zu erkennen. AAA ließ die Müllerzellen auf einen kleinen Streifen in der INL zusammenschrumpfen. Exogenes PEDF reduzierte den AAA-Effekt. Hier waren lange Zellfortsätze, im Vergleich zur AAA-Einzelbehandlung, zu erkennen. Die Müllerzell-Struktur war zwar deutlich, im Vergleich zur Kontrolle, angegriffen, zeigte aber dennoch einen deutlichen Unterschied zur AAA-Behandlung. Bei Betrachtung der Pax6- und F11-Färbungen fiel zunächst auf, dass zwischen AAA und der Kombination von PEDF mit AAA kaum ein Unterschied war. F11 färbt besonders stark die zellfortsatzreichen Regionen der OPL und IPL. Unter dem Einfluss von AAA war die Entwicklung der OLM und OPL gestört. In dieser späten AAA-Behandlung (ab

Tag 6) hatte sich die retinalen Strukturen bis Tag 6, wie in der Kontrolle entwickelt. Ab Tag 6 wurden die Explantate für 48 h 1 mM AAA ausgesetzt. In dieser Zeit war AAA in der Lage, die Struktur der OPL zu stören. Die F11⁺-OPL wirkte unstrukturiert und unterbrochen. Die OLM war nicht zu erkennen. AAA in Kombination mit PEDF bewirkte, dass die OPL als durchgehende Linie mit F11 angefärbt war, wobei bei genauerer Betrachtung Ansätze der OLM zu erkennen waren. Die Photorezeptoren hatten am Tag 8 alle mit ihrer Opsin-Expression begonnen. Unter AAA wurde die parallele Anordnung der Photorezeptoren-Zellkörper gestört, sodass sie diffus in der ONL lagen. PEDF sorgte für eine höhere Organisation in der OPL; sie ist sogar mit der Kontrolle vergleichbar.

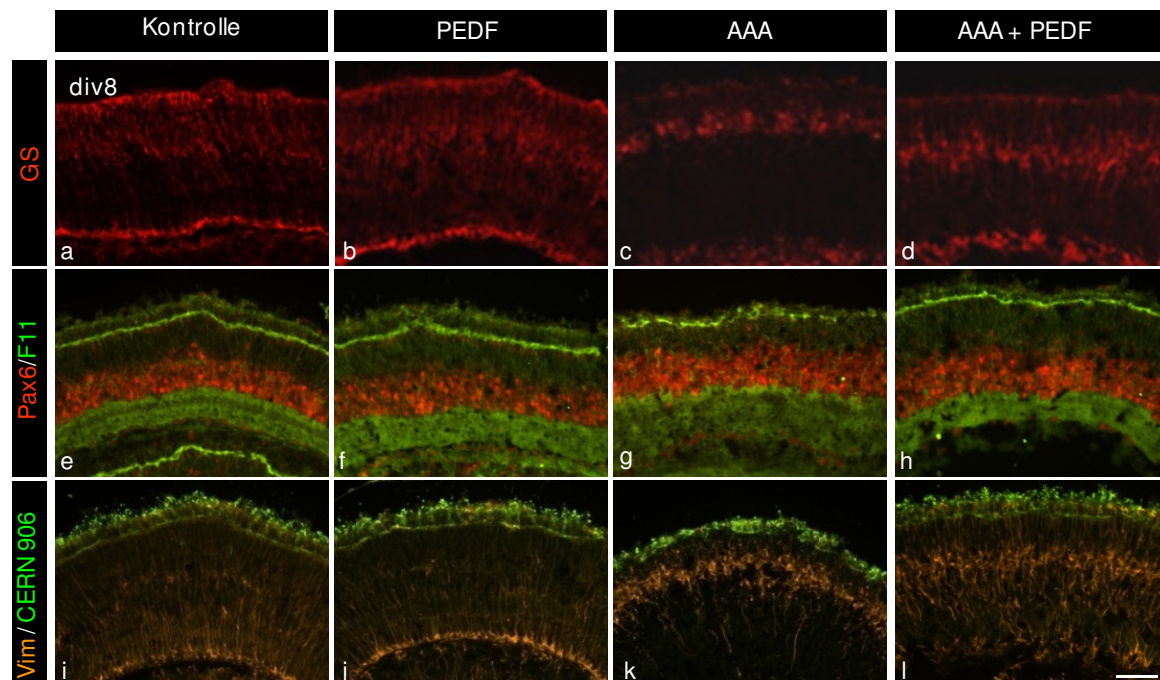


Abbildung 52. AAA *rescue* der Müllerzell-Struktur-, ONL- und OPL-Strukturen durch PEDF. Explantate wurden mit 50 ng/ml PEDF und/oder 1 mM AAA behandelt. Kryoschnitte von div8 wurden gegen GS (rot; a-d), F11 (grün; e-h), Pax6 (rot; e-h), Vimentin (orange; i-l) und Stäbchen (CERN 901; grün; i-l) gefärbt. PEDF bewirkt einen *rescue* der Müllerzell-Struktur (d und l). Beachte auch die höhere Organisation der OPL (grün; h) und der ONL (l). Vim.: Vimentin. Maßstab: 50 µm.

4.3.2.7 PEDF reduziert den oxidativen Stress von AAA im Explantat

PEDF hatte auch bei späterer AAA-Behandlung einen deutlichen Einfluss. Nicht nur, dass die Müllerzell-Struktur deutlich gestreckter erscheint, sondern die ONL und OLM war auch annähernd mit der Kontrolle zu vergleichen. In Abschnitt 4.2.6 wurde gezeigt, dass AAA in der Hühnerretina oxidativen Stress erzeugt. PEDF wirkte diesem toxischen Einfluss von AAA entgegen. Um zu beweisen, dass PEDF

den oxidativen Stress reduziert, wurden entsprechende Explantat-Proben erstellt, die mit dem Katalase-Test auf oxidativen Stress untersucht wurden. In Abbildung 53 sind die Daten von Kontrolle, PEDF- und/oder AAA-Behandlung dargestellt. Für dieses Experiment wurden 4 unabhängige Proben je Wert verwendet. Die Kontrolle zeigte einen leichten Anstieg der Katalase-Aktivität, welche sich ab Tag 6 *in vitro* auf eine maximale Aktivität eingependelt hatte (Vergleiche auch Abbildung 30). Die Einzelbehandlung mit PEDF bewirkte keine Änderung der Katalase-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle. AAA erzeugte oxidativen Stress, ebenfalls gezeigt in Abschnitt 4.2.6. Hierbei stieg die Katalase-Aktivität stetig an, um am Ende 5 mal höher als in der Kontrolle zu sein. PEDF reduzierte diesen oxidativen Stress bis fast auf ein normales Niveau. Um Tag 5 *in vitro* war eine erhöhte Katalase-Aktivität auch unter dem Einfluss von PEDF zu erkennen.

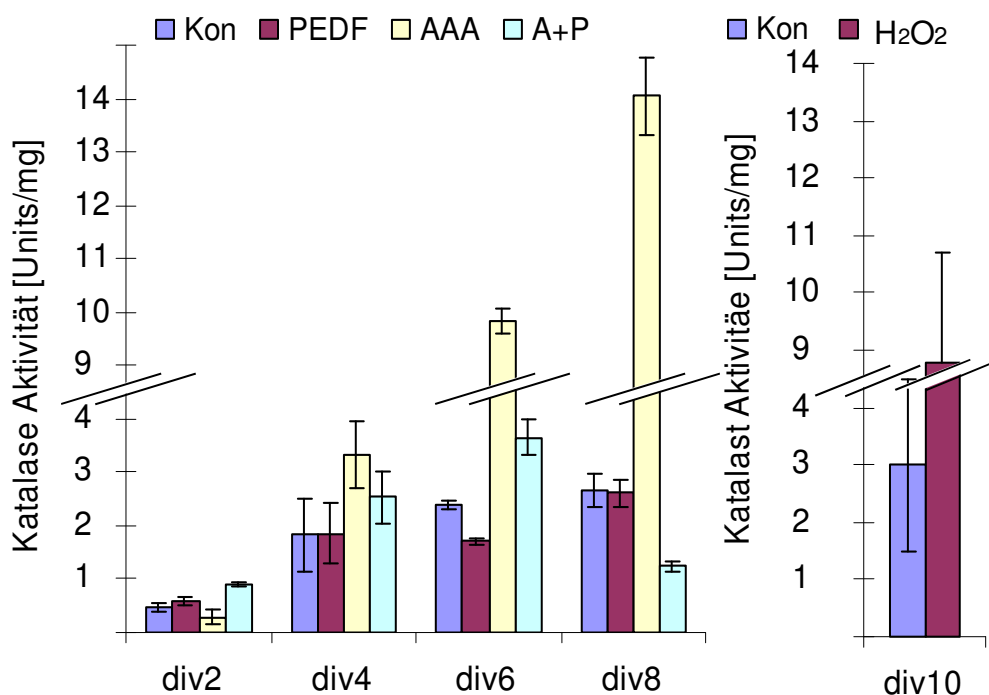


Abbildung 53. PEDF reduziert den durch AAA in Müllerzellen verursachten oxidativen Stress. Statistische Auswertung des Katalase-Tests mit ImageJ. PEDF senkt die erhöhte Katalase-Aktivität induziert durch AAA. Proben mit H₂O₂ Behandlung dienen als Positivkontrolle. (n=4) +/- SD.

Zusammengefasst verändert AAA das Expressionsmuster, sodass Müllerzellen bei höheren AAA-Konzentrationen ihre Zytokin-Expression bzw. die Expression der Zytokin-Rezeptoren einstellt. Unter diesen glotischen Bedingungen zeigt nur PEDF auf sämtlichen Ebenen (histologische Befunde, Katalase-Test und GFAP-

Expression) eine eindeutige reduzierende Wirkung auf die AAA-Gliose. PEDF reduziert nicht nur das gliotische Anschwellen der Müllerzellen, sondern auch den oxidativen Stress, gezeigt durch den Katalase-Test. Ein weiterer Beweis für die Wirkung von PEDF liefert die Reduktion der abnormen GFAP-Expression, welche bei der Gliose beobachtet wird. BDNF und GDNF haben zwar eine Wirkung auf retinales Gewebe, dass über die Müllerzellen vermittelt werden kann, sie zeigen allerdings keine Wirkung auf die AAA-Gliose.

5 Diskussion

5.1 Zellkulturtechniken

5.1.1 Retinale Entwicklung und die Expression relevanter Gene im Explantat

Bei jeder entwicklungsbiologischen Studie ist es wichtig, sich Gedanken über ein geeignetes Modellsystem zu machen. Jedes Modellsystem, das vom *in vivo*-Organismus abweicht, ist im besten Falle ein *in vivo*-ähnliches System. Je weiter sich ein Modellsystem von den *in vivo*-Verhältnissen entfernt, desto unwahrscheinlicher ist es, dass eine Substanz im Organismus die gleiche Wirkung erzielt. Das bereits etablierte Sphäroid-System (205) bietet nur begrenzt die Möglichkeit, die einzelnen Bereiche der Retina (ONL und IPL) zu studieren. Für diese Arbeit war es wichtig, dass sich ein isoliertes retinales Gewebe *in vivo*-artig mit allen charakteristischen Strukturen, wie z.B. den IPL-Subbanden, entwickelt. Das in dieser Arbeit optimierte und verwendete Explantatsystem bietet die Möglichkeit, die frühe retinale Entwicklung zu studieren. Eine umfassende Charakterisierung des Explantatsystems wurde bereits publiziert (71). Im Folgenden wird näher auf die Entwicklung der Müllerzellen und Photorezeptoren eingegangen, die in der publizierten Charakterisierung nur kurz behandelt wurden. Im Vergleich von Explantat-Kulturen und *in vivo*-Retina wurde eine hohe Strukturübereinstimmung zur *in vivo*-Retina festgestellt, allerdings wurden auch Unterschiede beobachtet. Anhand von immunhistochemischen Färbungen wurde eine beschleunigte Entwicklung von Müllerzellen und Photorezeptoren beobachtet. Die meisten retinalen Zellen durchlaufen eine Phase der Migration, bevor sie in der Differenzierung voranschreiten. Im Fall der Photorezeptoren hatten die Vorläufer der Photorezeptoren ihre Migration bereits vor der Präparation am embryonalen Tag E6 beendet. Die Rhodopsin- und Opsin-Expression beginnt *in vivo* ab E17 und in Kultur bereits am Tag 2 *in vitro* (Tag 2 *in vitro* entspricht E8 *in vivo*). Ein ähnliches Ergebnis wird von Bruhn *et al.* (1996) gezeigt, wo die Rhodopsin/Opsin-Expression wesentlich früher *in vitro* induziert wird als in der nativen Retina (243). Auch die Müllerzellen hatten ihre Position in der INL bereits vor der Präparation eingenommen. Die GS ist durch Antikörper ab Tag 2

(entspricht E8 *in vivo*) im Explantat nachzuweisen. In der *in vivo*-Retina ist die GS erst ab E14 mit Antikörpern anfärbbar. Beide Zelltypen waren mindestens 6 Tage früher im Explantat als in der *in vivo*-Retina entwickelt.

Die Vernetzung der Neuronen und die damit verbundene Bildung der zellkernfreien Bereiche (plexiforme Bereiche) haben zum Zeitpunkt der Präparation noch nicht begonnen. Unter Kulturbedingungen bilden sich neben den paarweise angeordneten *starburst amacrine cells* (SACs) auch die IPL-Subbanden (horizontale Verschaltung der Amakrinzellen, Bipolarzellen und Ganglienzellen in der IPL) in etwa zum gleichen Zeitpunkt, wie bei der *in vivo*-Retina. Hierbei ist zu sagen, dass ohne zusätzliche Faktoren (z.B. BDNF) die Ganglienzellen innerhalb der ersten Tage absterben.

Die immunhistochemischen Färbungen von *in vivo*-Retina und Explantaten wurden mit meinen Expressionsstudien vertieft. Hierbei wurde die Expression von relevanten Genen während der frühen retinalen Entwicklung *in vivo* und *in vitro* verglichen. Sämtliche untersuchten Gene wurden im retinalen Gewebe gefunden. Zwischen dem *in vivo* und *in vitro*-Status wurden keine gravierenden Unterschiede festgestellt. Lediglich GDNF und GFR α 4 erscheinen einen Tag später und TrkB ein Tag früher im Explantat. BDNF zeigt im Vergleich dazu einen ansteigenden Gradient im Explantat, während eine gleichbleibende Expression *in vivo* herrscht. Von BDNF ist bekannt, dass *in vitro*-Bedingungen eine gesteigerte BDNF-Expression im retinalen Gewebe erzeugen (244). Allein bei einer Verletzung des optischen Nervis (Sehnerv) steigt die BDNF-Expression in der Retina (111). Dieser Anstieg der BDNF-Expression benötigt im Explantatsystem 2 Tage, bis dieser seine maximale Expression erreicht hatte. Interessant ist, dass die Expression der GS bereits ab E6 auf der mRNA-Ebene nachweisbar ist. Gleiches gilt für Explantate: Hier war die GS ab dem ersten Tag *in vitro* nachweisbar. Hierzu wurden zwei verschiedene Primerpaare für GS verwendet, um diese Expression zu überprüfen. Für beide Primerpaare wurde diese frühe Expression nachgewiesen. Die Transkription bedeutet in diesem Fall nicht die automatische Translation, da GS mit Antikörpern erst ab E14 *in vivo*, bzw. Tag 2 *in vitro* nachweisbar wurde. Hierbei ist nicht auszuschließen, dass die GS nach der Translation durch proteolytische Modifikation oder Umlagerungen im Protein das Epitop für den GS-Antikörper erst entstehen lässt. Der GS-Antikörper ist in der

Literatur ein etablierter Marker (Antikörper) für die späte Entwicklung der Müllerzellen.

TrkB, GFR α 1 und besonders PEDF zeigten in beiden Untersuchungsobjekten, im Vergleich zu anderen Genen, einen späten Beginn der Expression. TrkB ist der Rezeptor für BDNF. Der Signalweg von BDNF bzw. TrkB ist für das Überleben der Ganglienzellen wichtig. Ohne BDNF sterben die Ganglienzellen innerhalb der ersten Tage nach der Präparation ab. Eine stabile Expression von TrkB bis Tag 8 *in vitro* zeigt, dass TrkB nicht nur in den Ganglienzellen zu finden ist, sondern zu einem nicht unerheblichen Teil in anderen Neuronen bzw. Müllerzellen exprimiert wurde. Die Katalase ist ein Protein, das bei der Beseitigung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), z.B. H₂O₂, beteiligt ist. H₂O₂ entsteht im Stoffwechsel als Nebenprodukt. Daher ist eine gewisse Expression der Katalase in den Zellen immer vorhanden. Die Katalase diene als biologischer Indikator für oxidativen Stress, da die Expression bei erhöhtem Stress ebenfalls steigt. In dieser Arbeit wurde neben dem Katalase-Test der oxidative Stress durch eine gesteigerte Expression der Katalase nachgewiesen. In Kultur scheint mit andauernder Kultivierung der oxidative Stress zu steigen, während *in vivo* die Expression relativ homogen blieb.

5.1.2 Auf welchem Weg übt Ascorbat eine neurotoxische Wirkung aus?

Ascorbat ist als effizientes Antioxidans bekannt. In dieser Arbeit wurde eindeutig gezeigt, dass hohe Konzentrationen von Ascorbat zum Absterben der Neuronen führten. Lediglich eine Arbeitsgruppe verwendete Ascorbat zur Isolierung von Müllerzellen aus neuralem Gewebe. Diese Publikation war der Ausgangspunkt meiner Ascorbat-Behandlung in retinalem Gewebe (218). In dieser Publikation wird allerdings kein Hinweis über den Wirkungsmechanismus gegeben. Giblin *et al.* (1991) (245) zeigen, dass die Konzentration von H₂O₂ in Gegenwart von hohen Ascorbat-Konzentrationen ebenfalls erhöht ist. Organismen mit hohen eigenen Ascorbat-Konzentrationen (Kaninchen und Meerschwein) zeigen auch ein hohes H₂O₂-Vorkommen; Organismen mit niedrigem Ascorbat-Spiegel (Frosch und Ratte) zeigen auch eine niedrige H₂O₂-Konzentration. Hieraus wird geschlossen, dass Ascorbat in manchen Organismen Ursache für erhöhtes H₂O₂ sein könnte.

Zwischen Ascorbat und dem H_2O_2 -Spiegel scheint ein direkter Zusammenhang zu bestehen. Daher ist es möglich, dass hohe Konzentrationen von Ascorbat oxidativen Stress erzeugen können. In dieser Arbeit wurde ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Katalase-Aktivität durch Ascorbat nachgewiesen. Ab einer Konzentration von 1 mM Ascorbat war die Katalase-Aktivität deutlich erhöht. Ascorbat-Konzentrationen von >1 mM Ascorbat zeigten eine neurotoxische Wirkung auf neuronales Gewebe. Aber warum sterben Neuronen unter dem Einfluss von 2 mM Ascorbat ab, Müllerzellen jedoch nicht? Die Aufnahme von hohen Dosen an Ascorbat über die Nahrung führt nicht zur Erblindung oder zum Absterben des Gehirns. Überschüssiges Ascorbat wird im Organismus über die Niere ausgeschieden, ohne einen toxischen Effekt auf Neuronen zu haben (246-247). Außerdem wird Ascorbat in neuronalem Gewebe in hohen Konzentrationen gefunden (248-249). Besonders die Gliazellen akkumulieren höhere Ascorbat-Konzentrationen als Neuronen (248-249). Unter normalen Bedingungen wird Ascorbat hauptsächlich in seiner oxidierten Form Dehydroascorbat über den *Glucosetransporter 1* (GLUT1) ins Gehirn-Retina-Gewebe aufgenommen. GLUT1 ist für den Transport durch die Blut-Hirn-Schranke und Blut-Retina-Schranke von Dehydroascorbat verantwortlich (250). Astrozyten und Neuronen können Ascorbat auch direkt über den *sodium-vitamin C transporter 2* (SVCT2) aufnehmen (251-252). Diese Arbeit zeigte, dass beide Ascorbattransporter (GLUT1 und SVCT2) in primären –Müllerzellen des Hühns exprimiert wurden. Castro (2009) schildert einen Mechanismus, wie Ascorbat zum Absterben der Neuronen führen kann (252): Durch die Aktivität der glutamatergen Synapsen nehmen Astrozyten Glutamat aus dem synaptischen Spalt über den Na^+ -abhängigen Glutamattransporter auf. Das intrazelluläre Glutamat stimuliert den Glukosetransport, die Glykolyse und den Laktatausstoß. Laktat wird von Neuronen aufgenommen, um ihren hohen energetischen Bedarf zu unterstützen. Die Glutamataufnahme stimuliert auch die Ascorbat-Freisetzung aus Astrozyten, welches von Neuronen über SVCT2 aufgenommen wird. Das intrazelluläre Ascorbat in den Neuronen inhibiert die Glukoseaufnahme über GLUT3 und stimuliert die Laktataufnahme in Neuronen. Extrazelluläres Ascorbat wird im neuronalen Gewebe durch Gliazellen reguliert (252). Unter Kulturbedingungen befindet sich das Ascorbat im Medium, sodass es in direkten Kontakt zu Neuronen

kommt. Ascorbat wird von den Neuronen aufgenommen, inhibiert dabei die Glukoseaufnahme und induziert somit Stress in den Neuronen. Die gesteigerte Laktataufnahme scheint dabei den Energiemangel durch Blockierung der Glukoseaufnahme nicht zu kompensieren, sodass die Neuronen absterben. Die Müllerzellen sind dabei an hohe Ascorbat-Konzentrationen gewöhnt und können auch unter diesen Bedingungen überleben (248-249). Zudem basiert die Glukoseaufnahme in Müllerzellen auf GLUT1. Eine Minimierung der Glukoseaufnahme in Müllerzellen durch Ascorbat-Einfluss wurde nicht beschrieben. Darüber hinaus kommen Müllerzellen mit wenig Energie (ATP) aus. Die Müllerzellen versorgen sich zum größten Teil nur aus der Glykolyse mit Energie. Das ausgeschüttete Endprodukt Laktat wird von den umliegenden Neuronen zur Energiegewinnung genutzt (253).

5.1.2.1 Selektive Wirkung von hohen Ascorbat-Konzentrationen auf 3D-Kultursysteme

Wird Ascorbat auf Rosettensphäroide angewendet, so zeigte sich, dass die toxische Wirkung von Ascorbat zuerst auf Neuronen der Gewebeoberfläche wirkt, während innere Strukturen (IPL und Rosetten) weitestgehend unangetastet blieben. Im Vergleich zur Aminoadipat (AAA)-Studie (diese Arbeit) und Glutamat (254), wird ein toxischer Effekt auf alle Müllerzellen und Amakrinzellen im

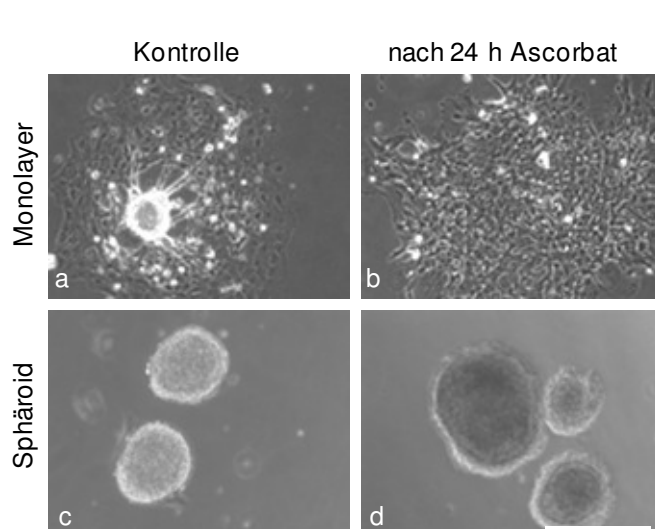


Abbildung 54. Gleicher Ascorbat-Effekt auf Gehirn-Monolayer und Sphäroiden. 2D- und 3D-Gehirn-Kulturen wurden zu div8 mit 2 mM Ascorbat behandelt und mikroskopisch dokumentiert. Ascorbat entfernt alle Neuronen im Monolayer (b) und bildet eine „äußere Region“ (d). Maßstab: 200 µm.

Sphäroid beobachtet. Ein ähnliches Phänomen wie mit 2 mM Ascorbat wurde für AAA und Glutamat nicht beobachtet. In der TUNEL-Färbung waren alle Zellen der „äußeren Region“ apoptotisch. Die TUNEL⁺-Zellen des Kernsphäroides ließen im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls den Schluss zu, dass Ascorbat zunächst toxisch auf Neuronen der Gewebeoberfläche wirkte und später auf Neuronen in

tieferen Schichten. Diese selektive toxische Wirkung von Ascorbat auf retinales Gewebe ließ sich auch auf Gehirngewebe übertragen (Abbildung 54). Das Gehirn besitzt eine ähnliche Zellzusammensetzung wie die Retina (Neuronen und Gliazellen). Andere Gewebetypen wurden nicht auf einen selektiven Effekt von Ascorbat untersucht. Bei der Recherche über die Wirkungsweise von Ascorbat zeigte sich, dass viele Studien Ascorbat als Krebs-Therapeutikum (232, 255-259) benutzen. Eine Studie verwendet verschiedene Mäuse bzw. humane Krebszelllinien und normale menschliche Zelllinien (Fibroblasten, Lymphozyten und Monozyten), um den Zelltod aufgrund einer Ascorbat-Behandlung zu untersuchen. Dabei wurde festgestellt, dass die meisten Krebszelllinien eine EC_{50} von 4 mM Ascorbat haben. Andere Zelllinien sind noch bei 20 mM Ascorbat unbeeinflusst (255). Diese Ergebnisse zeigen, dass Ascorbat für Krebszellen selektiv toxische Eigenschaften entwickelt, während 'normale' Zellen noch überleben. Neuronale oder retinale Zelllinien wurden in dieser und in anderen Studien allerdings nicht getestet. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass Ascorbat auch eine neurotoxische Wirkung in hohen Konzentrationen entwickelt. Für eine Behandlung im Körper spielt diese neurotoxische Wirkung allerdings keine Rolle, da zum einen überschüssiges Ascorbat ausgeschieden wird und zum anderen das Pigmentepithel bzw. die Müllerzellen die Ascorbat-Zufuhr an die Neuronen steuern.

5.1.3 Können relevante Zytokine auf Müllerzellen wirken?

Es wird vermutet, dass Müllerzellen eine Schlüsselrolle bei der Wirkung von exogenen Faktoren einnehmen. Der Effekt von GDNF und BDNF scheint dabei nur indirekt auf Photorezeptoren zu wirken, da sie keinen Rezeptor für BDNF oder GDNF exprimieren (73, 92, 173, 229, 260). Als wahrscheinlichster Kandidat für die Vermittlung der Zytokinwirkung gelten die Gliazellen. Im Fall des GDNF-Signalweges wurden sämtliche Komponenten (GDNF, GFR α 1-2 und cRet) in Müllerzellen mittels immunhistochemischen und molekularbiologischen Methoden in der Schweineretina identifiziert. Auf die gleiche Weise wurden die Photorezeptoren untersucht, wo keine Expression vom GDNF-Signalweg zu finden war (173). Interessant ist, dass in Müllerzellen des Schweins GFR α 3 exprimiert wird. In reinen Müllerzell-Populationen des Huhns wurde GFR α 3 zu

keinem Zeitpunkt gefunden. Im Bezug auf die Expression von GDNF und GFR α 1 in Müllerzellen und Photorezeptoren wird in einer Arbeit von Karlsson *et al.* (2002) eine ähnliche Expressionsverteilung untersucht (217). Hier wurden Hühnerretina mittels In Situ-Hybridisierung auf cRet, GDNF, GFR α 1 und 2 untersucht. Während alle untersuchten Gene in der inneren INL (Amakrinzellen und Müllerzellen) zu finden waren, wurde in der ONL (Photorezeptoren) nur GFR α 2 gefunden (217). In dieser Arbeit werden allerdings die Müllerzellen als Expressionsort für GDNF und GFR α 1 nicht benannt, wie es meine Arbeit für das Huhn gezeigt hat.

Die Sekretion von Wachstumsfaktoren, wie BDNF und GDNF, von Gliazellkulturen wurden anhand von Western blot-Studien im Kulturüberstand nachgewiesen (261). In den meisten Organismen stellen die Müllerzellen nur eine Sorte von Gliazellen in der Retina dar. Die Hühnerretina ist für die Frage, ob speziell die Müllerzellen eine entscheidende Rolle bei der Wirkung von exogenen Faktoren einnehmen, von besonderem Interesse, da die Gliazellen der Hühnerretina nur aus Müllerzellen bestehen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Müllerzellen als Ressource für Zytokine den umliegenden Neuronen dienen können. Darüber hinaus exprimieren die Müllerzellen alle bekannten Rezeptoren für die untersuchten Zytokine. Der Rezeptor für PEDF ist bislang nicht eindeutig identifiziert worden. Eine Studie konnte zeigen, dass PEDF an Proteinen der Zelloberflächen von Pigmentepithelzellen bindet und diese Oberflächenproteine zur *patatin-like phospholipase domain-containing 2* (PNPLA2) Familie gehören (135). Über radioaktiv markiertes PEDF wurde festgestellt, dass PEDF auch innerhalb der Retina in der ONL und GCL (262) bindet. In der ONL scheint PEDF allerdings nur an Glycosaminoglycane zu binden. Weitere Studien müssen zeigen, ob PNPLA2 der PEDF-Rezeptor ist und ob er in Müllerzellen und/oder Photorezeptoren exprimiert wird.

5.1.4 Die Entwicklung der Müllerzellen ist abhängig von Photorezeptoren

Die Arbeiten von Linser zeigen, dass reine Müllerzell-Populationen eine Art Rückentwicklung durch den Verlust der GS-Expression erfahren (197, 227). Die GS-Expression wird hierbei nur in Mischkulturen von Gliazellen und Neuronen gefunden. In reinen Müllerzell-Populationen ist die GS-Expression abwesend.

Hierbei werden reine Müllerzell-Populationen als Monolayer mit 3D-Mischkulturen verglichen. Eigene Studien zeigen, dass die 3-Dimensionalität hierbei keine Rolle spielt. Reine Müllerzell-Sphäroide, erstellt durch Ascorbat-Behandlung von herkömmlichen Rosettensphäroiden, weisen ebenfalls keine GS-Expression auf.

Bei diesem Effekt scheint der Kontaktverlust zu Photorezeptoren einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung der Müllerzellen zu haben. In einer Studie von Grosche *et al.* (1995), werden Ratten durch intensive Lichteinwirkung geblendet. Die enzymatisch isolierten Müllerzellen werden daraufhin auf GS untersucht (57). Eine GS-Expression wurde nicht gefunden. Diese Studie zeigt allerdings nicht den direkten Zusammenhang zwischen der fehlenden GS-Expression in Abwesenheit von Photorezeptoren im retinalen Gewebe. Deswegen wurden in dieser Arbeit Stratosphäroide mit einer vorteilhaften Orientierung der Photorezeptoren auf der Gewebeaußenseite mit Ascorbat behandelt. Hierdurch war es möglich, die Photorezeptoren zu beseitigen, ohne tiefer liegende Neuronen und Strukturen zu beeinträchtigen. Die histologischen Befunde dieser Arbeit zeigten eindeutig, dass zwischen der GS-Expression und dem Kontakt zu Photorezeptoren ein direkter Zusammenhang besteht. Aufgrund der strengen lokalen Wirkung von Photorezeptoren auf die GS-Expression ist eine Sekretion eines Faktors auszuschliessen. Bei allen Befunden wurde nicht geklärt, inwieweit Stäbchen oder Zapfen für diese Wirkung verantwortlich sind. Eine Untersuchung mit der selektiven Entfernung eines der zwei Photorezeptorzelltypen wäre von Nöten, um diese Frage zu beantworten. Die GS-Expression scheint mit der GS-Aktivität im Zusammenhang zu stehen. Die GS-Aktivität wird durch ausgeschüttetes Glutamat von den Neuronen (Photorezeptoren) stimuliert (57). Somit führt der Verlust von Glutamat-ausschüttenden Neuronen zur Inaktivierung der GS-Aktivität in Müllerzellen und möglicherweise zur reduzierten GS-Expression.

Auch wenn die GS mittels Antikörper nicht nachweisbar war, wurde eine gewisse Basis-Expression auf mRNA-Ebene in den reinen Müllerzellen nachgewiesen. Schon beim Vergleich der Genexpression zwischen *in vivo* und *in vitro* wurde eine GS-Expression in frühen Stadien bzw. Kulturtagen nachgewiesen, die in der Immunfärbung nicht zu bestätigen war. Unter Umständen besteht auch hier ein Zusammenhang zwischen der Reifung der Photorezeptoren und der

Differenzierung (GS-Expression) der Müllerzellen. Es wird vermutet, dass die Müllerzellen einen Vorläuferstatus einnehmen. Dabei fällt auf, dass nicht alle Gene eine Expression eines Müllerzell-Vorläufers einnehmen. Während einige Gene wie PEDF nur in weiterdifferenzierten Zellen exprimiert wird ist die GS-Expression in den reinen Müllerzellen abwesend. PEDF wird erst ab E12 *in vivo* und Tag 6 *in vitro* exprimiert. Würden die Müllerzellen einen Vorläuferstatus einnehmen (vor Tag 2 *in vitro*), würde die Expression von PEDF nicht vorhanden sein. Unter Umständen wird in Müllerzellen nur ein bestimmtes *set* (z.B. GS) an Genen durch den Kontakt mit Photorezeptoren reguliert. Alle anderen Gene werden auf den Status einer differenzierten Müllerzelle hin exprimiert.

Diese Arbeit zeigte, dass alle untersuchten Wachstumsfaktoren und ihre direkten Rezeptoren (Ausnahme PEDF-Rezeptor) in primären Hühner-Müllerzellen exprimiert wurden. Somit können Müllerzellen auf die verwendeten exogenen Zytokine reagieren und auch als Ressource für die umliegenden Neuronen dienen. Dabei wurden GFR α 3 und 4 in reinen Müllerzellen nicht exprimiert; die Signalwege über Artemin und Persephin scheinen also eine kleinere Rolle in Müllerzellen des Huhns zu spielen. Die BDNF-Expression war in Müllerzellen wesentlich geringer, als in der vergleichbaren *in vivo*-Retina zu E14. Unter Berücksichtigung, dass die BDNF-Expression in Kultur steigt, wurde hier deutlich, dass ein Teil der BDNF-Expression nicht von den Müllerzellen kommt, sondern von Neuronen.

5.2 Wie wirkt AAA auf retinales Gewebe?

5.2.1 Konzentrationabhängige Wirkung von AAA

Für diese Arbeit stand nicht die schnellstmögliche Eliminierung der Müllerzellen im Vordergrund, sondern es sollten die Auswirkungen von AAA auf Müllerzellen ausgenutzt werden, um ein Gliosemodell zu erstellen, das für weitere Experimente genutzt werden kann. Deshalb wurde eine AAA-Konzentration von 1 mM verwendet, bei dem die Müllerzellen nicht zu schnell absterben. Höhere AAA-Konzentrationen zeigten einen massiven Verlust der retinalen Struktur, sodass sich die einzelnen retinalen Schichten nicht mehr durch IPL-Bereiche unterscheiden. Vergleichbare Studien mit höheren AAA-Konzentrationen berichten von ähnlicher zerstörender Wirkung von AAA (15, 263). In Kombination von

dissoziiertem retinalem Gewebe aus zwei unterschiedlichen Spezies (Wachtel und Huhn) wird unter normalen Bedingungen ein räumlich sortiertes Gewebe zwischen den Spezies erzeugt. Wird allerdings AAA zugegeben, lösen sich bei höheren Konzentrationen die Grenzen zwischen den Spezies auf (15).

5.2.2 Wirkt AAA auf sämtliche Entwicklungsstadien gleich?

Ein weiterer interessanter Punkt von AAA ist die unterschiedlich starke Wirkung auf verschiedene Entwicklungsstadien. Durch Injektion von AAA kann gezeigt werden, dass der Augendurchmesser, die Retinadicke und die Zellzahl in späteren Entwicklungsstadien der Ratte wesentlich stärker betroffen sind als an früheren (264). Auch die GS-Aktivität ist stärker in späteren als in früheren Stadien beeinträchtigt (63). In eigenen Studien im Explantat zeigte sich ein ähnlicher Effekt: Je älter bzw. weiter entwickelt das Explantat war, desto zerstörerischer war die Wirkung von AAA auf die Struktur des Gewebes. Die Intensität der AAA-Wirkung ist somit abhängig vom Entwicklungsstadium der Müllerzellen. AAA wirkt toxischer auf weiter entwickelte Müllerzellen. Dieser Eindruck wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass reine Müllerzell-Populationen durch 1 mM AAA kaum beeinträchtigt wurden. Auch höhere AAA-Konzentrationen (4 mM) zeigten nach 48 h keine Veränderung in der Müllerzell-Morphologie. Wie oben diskutiert, nimmt der Grad der Müllerzell-Entwicklung in Abwesenheit von Photorezeptoren ab. Diese Ergebnisse zeigen, dass in weiter differenzierter Retina geringere AAA-Konzentrationen von Nöten sind, als in früheren, um einen vergleichbaren Effekt zu erzielen.

5.2.3 Warum reagieren apikale retinale Strukturen stärker auf AAA?

Zu den ersten Effekten von AAA zählt das gliotische Anschwellen der Müllerzellen und die Bildung eines 'INL-Risses'. Der 'Riss' entsteht durch den großen Platzbedarf der angeschwollenen Müllerzellen, bei dem die umliegenden Neuronen zur Seite gedrückt werden. Studien, die sich mit der AAA-Wirkung und der GS-Aktivität oder -Expression beschäftigen, berichten von einer konzentrationsabhängigen Reduktion der GS-Aktivität oder -Expression durch AAA (63, 227, 263). In den histologischen Befunden dieser Arbeit wurde deutlich,

dass die GS-Expression mit steigenden AAA-Konzentrationen sinkt bzw. bei hohen AAA-Konzentrationen abwesend war. Für die hohen AAA-Konzentrationen ist allerdings zu vermuten, dass sämtliche Müllerzellen bis zum Betrachtungszeitpunkt abgestorben waren. Interessant ist, dass AAA einen größeren Effekt auf die apikale Hälfte der Retina hatte, als auf die basale Seite. Färbungen gegen GS und Vimentin zeigten, dass apikale Müllerzell-Fortsätze nur schwach zu erkennen sind und dass die geordnete Struktur der ONL aufgehoben war. Die Vimentin-Färbung in der apikalen Hälfte der Retina war sogar ganz abwesend. Unter normalen Bedingungen war GS im apikalen Bereich in der OLM (dem Müllerzell-Endfuß) und in der OPL nachzuweisen; Ähnliches gilt für Vimentin. Unter AAA-Einfluss waren diese Strukturen nicht mehr GS⁺ und Vimentin⁺ gefärbt. Besonders die Vimentin-Färbung wurde durch die AAA-Behandlung stark im apikalen Bereich der Retina reduziert. Auf der basalen Seite waren alle Strukturen der GS- und Vimentin-Färbung in etwa vergleich zur Kontrolle ausgeprägt. Der Müllerzell-Endfuß in der GCL war zwar aufgelockert, aber deutlich als Linie zu erkennen. Auf Grund der Form des Explantates und den Kulturbedingungen könnte der Anschein erweckt werden, dass die Veränderung der ONL zwingend sein muss, da die Gewebeaußenseite von der ONL gebildet wurde. Dem widersprechen Studien, bei denen AAA in den Glaskörper injiziert wurde (64-65). Diese Studien zeigten Effekte in der ONL, aber nicht in der GCL. Auch eigene Studien im Sphäroidmodell zeigten, dass zuerst alle Rosettenstrukturen verschwanden, und dann die IPL-Strukturen von der AAA-Behandlung betroffen waren. Somit reagieren die apikalen Zellfortsätze der Müllerzellen wesentlich stärker auf AAA als basale Fortsätze. Der Grund, warum die apikalen Strukturen der Müllerzellen stärker betroffen sind, kann nur vermutet werden. Offenbar hat die Blockierung der Glutamataufnahme mit diesem Verhalten zu tun. Gerade Gliazellen sind mit Na⁺-abhängigen Glutamattransportern ausgerüstet (41-43, 45). Wie später noch ausführlich beschrieben wird, blockiert AAA den Glutamatimport. Somit führt diese Blockierung zu einer gestörten Kommunikation zwischen Müllerzellen und den Glutamat-ausschüttenden Neuronen (Photorezeptoren). Die Störung könnte somit der Grund sein, warum die Müllerzellen ihre Zellfortsätze speziell aus der apikalen Seite der Retina zurückziehen.

5.2.4 Wie wirkt α -Aminoadipat (AAA) auf die Genexpression relevanter Gene?

Der durch AAA erzeugte oxidative Stress zerstört das komplexe Gefüge der Retina. Eigene Expressionsstudien zeigten, dass auch das Expressionsmuster relevanter Gene unter dem AAA-Einfluss leidet. Diese Arbeit zeigte, dass bestimmte Gene, wie GDNF, GFR α 1, TrkB und PEDF wesentlich stärker auf steigende AAA-Konzentrationen reagieren als andere (BDNF, GFR α 2 und 4). GDNF und sein direkter Rezeptor GFR α 1 waren durch AAA im Explantat wesentlich stärker betroffen, als GFR α 2 und GFR α 4. GDNF ist ein entscheidender Faktor für das Überleben der Photorezeptoren unter Stressbedingungen, wie z.B. bei starkem Lichtreiz, oder der Retinitis pigmentosa (181, 216, 265-266). Von DL- α -AAA ist auch bekannt, dass es keine schädliche Wirkung auf Photorezeptoren ausübt, lediglich die Struktur der ONL ist betroffen (65) (über die Spezifität von L-, D- und DL- α -AAA, siehe Einleitung). Auch wenn die Expression von BDNF erst bei höheren AAA-Konzentrationen reduziert wurde, ist die Expression von seinem Rezeptor im Explantat wesentlich stärker betroffen. In den BDNF/Forskolin-Studien (Diplomarbeit Julia Wiedemann) wurde gezeigt, dass allein eine leicht erhöhte Präsenz des BDNF-Rezeptors auf der Zelloberfläche zu einer Steigerung des Ganglienzell-Überlebens und der retinalen Entwicklung führt. Die Steigerung wurde nur durch Zugabe von 5 μ M Forskolin erreicht, ohne exogenes BDNF zu verwenden. Eine Reduktion des Rezeptors (TrkB) durch AAA greift somit die gesamte Entwicklung des Explantates an und das Retina-exprimierte BDNF kann eine geringere Wirkung erzielen. Auch die PEDF-Expression wird durch AAA stark reduziert. Diese Arbeit konnte keine Aussage über eine Expression des PEDF-Rezeptors in Müllerzellen oder im Explantat unter AAA-Einfluss treffen, da der Rezeptor bislang nicht eindeutig identifiziert ist. PEDF schützt, ähnlich wie GDNF, Photorezeptoren vor Licht-induziertem Photorezeptoren-Absterben und reduziert den Zelltod im Mausmodell für Retinitis Pigmentosa (139, 148-149, 267). Takaeda *et al.* (2008) berichten, dass die Müllerzellen Eigenschaften eines Vorläufers unter AAA-Einfluss annehmen (268). Die Arbeitsgruppe injizierte subretinal niedrige Dosen (1 μ g/erwachsene Maus) an AAA und beobachtete eine Steigerung der Proliferation, bzw. eine niedrigere Apoptose in retinalem Gewebe, wie es bei einer Glutamat-Applikation der Fall ist. Desweiteren wurden Mitochondrien-Marker, wie

Phospho-histone H3 (pHisH3), und Vorläufer-Zellmarker, wie Nestin und Chx10 unter AAA-Einfluss in Müllerzellen nachgewiesen, was auf den Wiedereintritt der Müllerzellen in die Mitose hinweist. Über positive Eigenschaften von niedrigen AAA-Konzentrationen wird auch in einer anderen Arbeitsgruppe berichtet (269). AAA steigerte in niedriger Konzentration (< 0,5 mM) sogar die Glutaminsynthetase-Aktivität. Auch in dieser Arbeit wird deutlich, dass AAA seine Toxizität jenseits von 1 mM AAA entwickelt, da die AAA-induzierte Aktivierung der GS einen Maximalwert bei ca. 0,8 mM AAA erreicht und dann schlagartig sinkt. Diese Arbeiten zeigen, dass die Konzentration eines Stoffes entscheidend ist für die Wirkung und die Entwicklung toxischer Eigenschaften.

Drei wichtige Signale sind somit durch oxidativen Stress über AAA in Müllerzellen beeinträchtigt. Die Müllerzell-Gliose durch AAA erzeugt ein völlig anderes Expressionsmuster als unter normalen Kulturbedingungen. Bei Retina-degenerativen Krankheiten können die Müllerzellen keine Überlebenssignale (Faktoren) an die Photorezeptoren ausschütten, um so das Absterben der Neuronen zu fördern. Alle Signale erfüllen wichtige Aufgaben bei der Erhaltung der Struktur und Funktion der Retina. Durch Erhaltung des Expressionsmusters in Müllerzellen, bzw. Behandlung der Müllerzell-Gliose, würde sich eine entscheidende Verbesserung des Krankheitsverlaufes ergeben.

5.2.5 Was kennzeichnet eine Gliose in der Retina und welchen Zusammenhang gibt es zu α -Aminoadipat (AAA)?

Die Gliose in Müllerzellen ist charakterisiert durch stereotype Änderungen, pathogene Faktoren und Mechanismen. Eine der empfindlichsten Reaktionen auf retinale Erkrankungen und Verletzungen ist die Hochregulation des Intermediärfilamentproteins *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) (53, 55, 270). Dieser Marker gilt als universeller Marker für frühe zelluläre Schädigung in der Retina. Bei den verschiedenen Retina-degenerativen Krankheiten wurde eine Stimulierung der GFAP-Expression und ein Anschellen des Zellkörpers beobachtet, wie z.B. bei Retinaablösung (54, 271-272), Proliferative Retinopathie (271, 273), Diabetische Retinopathie (274-277), Ischemia reperfusion (278-280), Inflammation (281) und Glaucom (271, 282). Somit kann die GFAP-Expression als Marker für die Gliose verwendet werden. Als weiteres Merkmal gilt die

Veränderung der K^+ -Leitfähigkeit der Membran, was auf einer Mißlokalisierung des Kir4.1-Kanals in Müllerzellen beruht (283). Kir4.1 wird in der Retina speziell von Müllerzellen exprimiert und ist für den Ionen-Ausstrom verantwortlich. Dabei besteht zwischen dem Ionen-Ausstrom und dem Wassertransport über Aquaporin4 eine direkte Kopplung. Somit reichert sich unter gliotischen Bedingungen Flüssigkeit in den Müllerzellen an, da der Wasserausstrom durch die fehlende Kir4.1-Expression gestört ist (284-286). Die fehlende Kir4.1-Expression und das Anschwellen der Müllerzellen wurden bei verschiedenen retinalen Krankheiten beobachtet: Folgeerscheinungen, wie Diabetes (277), retinale Ischämie (280), Retinaablösung (287) und Endotoxin-induzierte Augenentzündung (281) treten auf.

Um den Zusammenhang von gliaspezifischem Toxin, AAA und dem Erscheinungsbild der Gliose zu verdeutlichen, liefert diese Arbeit eindeutige Beweise, dass AAA eine Gliose erzeugt: Durch AAA schwellen die Müllerzellen an und der charakteristische Gliose-Marker GFAP wurde durch AAA stimuliert. Beide Vorgänge wurden bei verschiedenen retinalen Krankheiten beobachtet (s.o.). In einer anderen Arbeit von Ganesh *et al.* (2011) wird AAA eingesetzt, um einer Gliose möglicherweise entgegen zu wirken (288). Die Gliose wird hier durch Injektion von Kainsäure in den Humor des Glaskörpers der Maus erzeugt. Die zusätzliche Behandlung mit AAA erzeugte weder eine Inhibition der Gliose, noch eine Reduktion des von Kainsäure induzierten Ganglienzelltods. Etwas widersprüchlich ist die Aussage, dass AAA die GFAP-Expression senkt. Bei genauerer Betrachtung steigt die GFAP-Expression von 24 Stunden auf 48 Stunden nach AAA-Behandlung an. Offensichtlich handelt es sich bei der gesunkenen GFAP-Expression nur um eine kurzweilige Reaktion auf das Glia-Toxin, z.B. durch das Absterben der GFAP-exprimierenden Astrozyten und einer verzögerten Stimulierung der GFAP-Expression in Müllerzellen, die in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde. Desweiteren wird der Zusammenhang zwischen AAA und einer Stimulierung der GFAP-Expression von Rich *et al.* (1995) beobachtet (65). GFAP wird hier als Gliazell-Stressmarker verwendet, um den durch AAA-induzierten Stress zu belegen. Die eindeutigen Ergebnisse von Rich werden in der Arbeit von Ganesh nicht berücksichtigt und stehen somit in direktem Widerspruch zueinander. Eine Injektion von 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ AAA-Lösung sorgt bei Rich

für eine Auflösung der OLM und somit für eine deutliche Reaktion der Retina auf AAA. Bei Ganesh wird ab 100 µg/µl eine Reduktion der GFAP-Expression beobachtet. Der einzige Unterschied zwischen diesen Publikationen ist der Injektionsort. Ganesh injiziert die AAA-Lösung in den Humor des Glaskörpers und Rich macht dies intravitreal. Die eigenen Studien geben eindeutige Hinweise darauf, dass AAA die GFAP-Expression stimuliert und nicht inhibiert, da die GFAP-Expression nur in AAA-behandelten Proben zu finden war.

Die Ursache für eine Gliose hat verschiedene Gründe. Ein Grund, der für das Gliosemodell dieser Arbeit wichtig war, ist die Erzeugung der Gliose durch oxidativen Stress. Es konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress zu einer reduzierten Kir4.1-Expression führt und so eine Gliose auslöst (234). Aus den eigenen Studien wurde ersichtlich, dass AAA zu einer gesteigerten Katalase-Aktivität und -Expression führt. Beides sind etablierte Verfahren, um oxidativen Stress nachzuweisen. Hier war die müllerzellspezifische Wirkung von AAA ein besonderer Vorteil, da der oxidative Stress nur in Müllerzellen erzeugt wird. Hierbei ist zu erwähnen, dass die Toxizität der DL- α -AAA Mischung nur auf Müllerzellen beschränkt ist, wie es in vielen Studien überprüft wurde (29, 36-37, 39, 59, 289). Somit kann eine AAA-Behandlung als Gliosemodell dienen.

5.2.6 Wie erzeugt DL- α -Aminoadipat (AAA) eine Gliose in Müllerzellen?

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit und den Angaben der Literatur lässt sich ein Mechanismus zusammenstellen, welcher den Zusammenhang zwischen AAA-Toxizität und der Gliose erklärt. Die Anreicherung von Flüssigkeit in Müllerzellen mit dem anschließenden Absterben löst in der nativen Retina die Bildung von retinalen Ödemen aus. Die Flüssigkeit in den Müllerzellen kann aus drei Quellen stammen: 1. Durch Aufnahme von Wasser aus dem Blut gelangen neben Wasser auch Nährstoffe in die Zellen. 2. Resorption von Wasser, das von den Neuronen ausgeschüttet wird. 3. Resorption von Wasser aus dem Glaskörper. Die Richtung und die Abfuhr von Wasser ins Blut wird durch einen osmotischen Druck von Natrium- und Chlorid-Ionen gesteuert (284, 290-291).

Abbildung 55 erläutert in einer schematischen Darstellung die Ursache für eine Flüssigkeitsansammlung in Müllerzellen. Unter normalen Bedingungen schütten

aktivierte Neuronen Natrium-Ionen aus, was zu einer Depolarisation und einer Übererregung der Neuronen führt. Dies hat eine übermäßige Freisetzung an Neurotransmittern und eine Glutamattoxizität zur Folge (292). Die Müllerzellen nehmen den Überschuss an Kalium auf und geben ihn ins Blutgefäß ab (292). Die Müllerzelle besitzt spezielle Kaliumkanäle zwischen Neuronen und Müllerzellen (Kir2.1), sowie zwischen Müllerzellen und Blutgefäß (Kir4.1) (284-286). Der Kaliumtransport ist gekoppelt mit dem Wassertransport, da die Kaliumtransporter (Kir) und die Wassertransporter (Aquaporin4) kolokalisiert sind (284). Eine Störung des Kaliumtransportes führt zu einer gestörten Wasserabgabe in Müllerzellen und so zur Anreicherung von Wasser, was am Ende zu Ödemen im retinalen Gewebe führt. Bei näheren Untersuchungen zeigte sich, dass der Einstrom von Kalium in Müllerzellen unter ischämischen Bedingungen nicht gestört wird, allerdings die Expression von Kir4.1 gestört ist. Somit reichert sich Wasser und Natrium in den Müllerzellen an. Der erhöhte osmotische Druck steigert zusätzlich die Wasseraufnahme, bis die Müllerzellen sterben (286). Die Behandlung mit H₂O₂ induziert osmotisches Anschwellen von Müllerzellen (277, 287, 293). Der resultierende oxidative Stress aktiviert die Phospholipase A2 und Cyclooxygenase, was Arachidonsäure und Prostaglandin sowie Lipidperoxidation stimuliert und einen intrazellulären Natriumüberschuss erzeugt (294-295). Durch oxidativen Stress wird gleichzeitig der kompensierende Kaliumausstrom blockiert, und die extrazelluläre Arachidonsäure inaktiviert die Natriumpumpen (296-297). Arachidonsäure reguliert spannungsabhängige Kanäle für den Kaliumausstoß (Kir4.1) herunter (271, 283, 298-299). Die Müllerzellen reichern Natrium- und Kalium-Ionen in den Zellen an, was einen osmotischen Druck erzeugt, sodass über den Wassertransporter Aquaporin weiteres Wasser in die Müllerzellen gelangt (300). Die Müllerzelle schwillt an. Durch die Aktivierung der Phospholipase A2 und Arachidonsäure wird das Anschwellen der Müllerzellen gefördert (277, 287, 293). Arachidonsäure und Prostaglandin sind inflammatorische Faktoren. In dieser Arbeit wurde anhand des Katalase-Tests gezeigt, dass AAA auch im Hühner-Explantat oxidativen Stress erzeugt und dass dieser Stress zum Anschwellen der Müllerzellen führt. Darüber hinaus wurde in verschiedenen Arbeiten gezeigt, dass AAA spezifisch gegen Müllerzellen gerichtet ist. Somit

bietet sich die Anwendung von AAA auf Retina-Explantate als ideales Gliosemodell an.

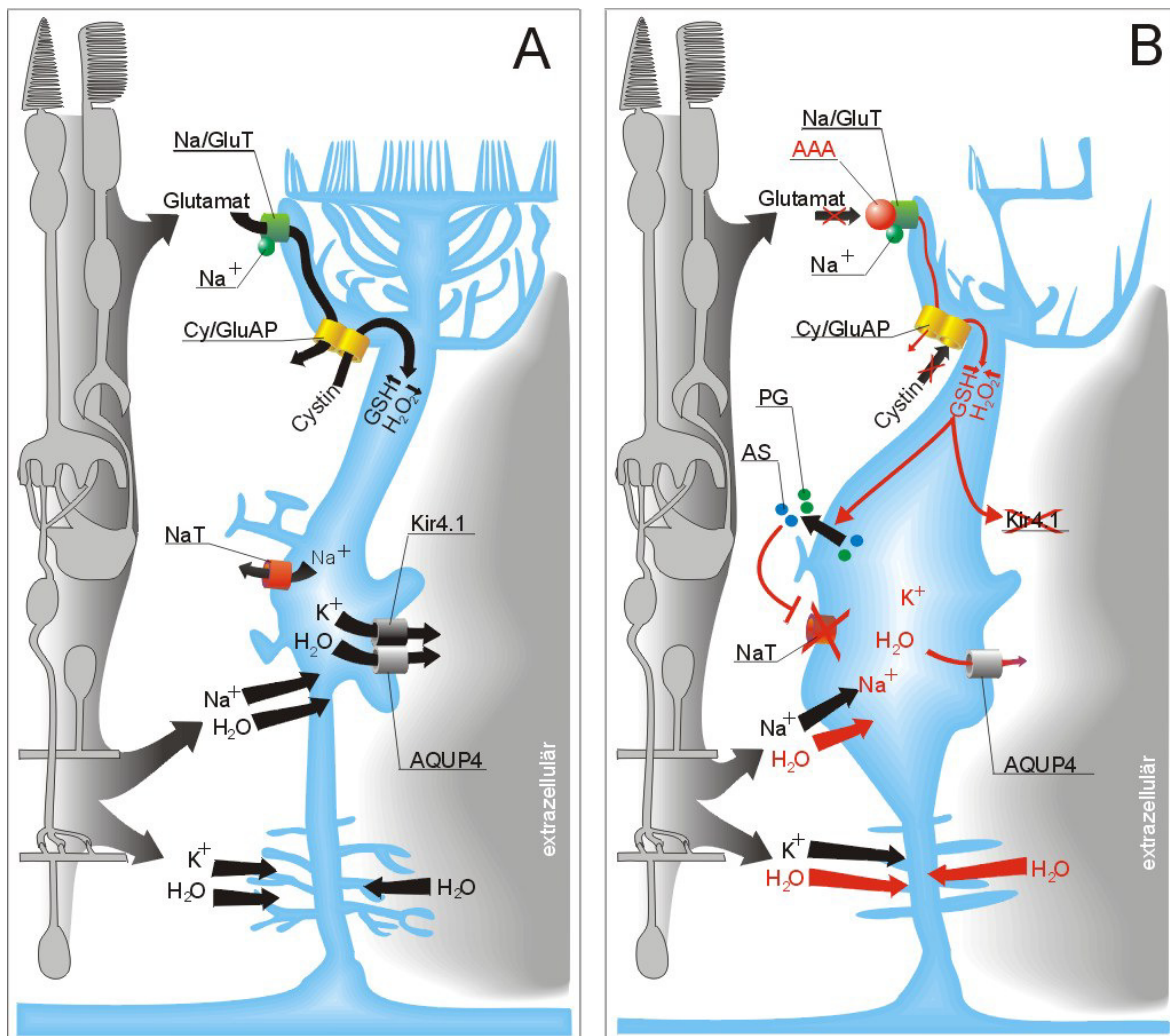


Abbildung 55. Schematische Darstellung des Anschwellens von Müllerzellen unter Aminoacidipat (AAA). A) Unter normalen Bedingungen überführen die Müllerzellen, durch einen gekoppelten Transport von Wasser (durch den Aquaporin 4 Wasser-Kanal AQP4) und Kalium (durch Kir2.1 für die Aufnahme und Kir4.1 für die Abgabe ins Blut) überschüssige Flüssigkeit ins Blut. Die Entstehung reaktiver Sauerstoffe im Stoffwechsel wird durch GSH abgebaut. Die Bildung von GSH in Müllerzellen ist von der Cystin-Einfuhr über den Cystin/Glutamat-Antiporter und der Glutamat-Aufnahme über den Natrium-abhängigen Glutamatttransporter (Na/GluT) abhängig. B) AAA erzeugt oxidativen Stress durch die Blockierung des Natrium-abhängigen Glutamatttransporters, welcher die Cystinaufnahme und somit den Abbau von reaktiven Sauerstoffen durch GSH senkt. Der entstandene oxidative Stress führt zur Ausschüttung inflammatorischer Faktoren, wie Arachidonsäure (AA) und Prostaglandin (PG). Diese Faktoren sorgen für eine Blockierung des Natrium-Ausstroms (NaT) und für eine Anreicherung von Natrium in den Müllerzellen. Gleichzeitig wird die Expression des Kaliumkanals Kir4.1 reduziert, was den osmotischen Druck noch verstärkt. Die Anreicherung von Natrium- und Kalium-Ionen lässt die Müllerzellen anschwellen. Na/GluT: Natrium-abhängiger Glutamatttransporter; Cy/GluAP: Cystin/Glutamat-Antiporter; PG: Prostaglandin; AA: Arachidonsäure; NaT: Natriumtransporter; AQP4: Aquaporin 4; GSH: Glutathion. Schema erstellt nach Reichenbach (2007) (234) und Kato 1996 (40).

5.3 Die Wirkung von Wachstumsfaktoren auf Explantate und auf das α -Aminoadipat (AAA)-Gliosemodell

5.3.1 Allgemeine Wirkung von relevanten neurotrophen Faktoren auf die Entwicklung der gesamten Retina

Um zu verstehen, ob Wachstumsfaktoren gegen die retinale Gliose helfen, ist es wichtig, die Wirkung der Faktoren auf die Entwicklung der Retina zu studieren. Daher befasst sich der erste Teil dieses Kapitels mit der Frage: Wie wirken allgemein relevante Wachstumsfaktoren auf die retinale Entwicklung? In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse aus zwei von mir betreuten Diplomarbeiten mit diskutiert, die sich mit der Wirkung von BDNF und PEDF auf Retina-Explantate beschäftigten. Die verwendeten Zytokine haben ihre Relevanz für diese Arbeit in verschiedenen Arbeitsgruppen bewiesen. Alle Faktoren, die in dieser Arbeit verwendet wurden, zeigen eine Wirkung bei verschiedenen Retina-degenerativen Krankheiten, wie Retinaablösung, diabetische Retinopathie, Makulaödem, Ischämie-Reperfusion, Retinoschisis, hepatische Retinopathie und Retinitis pigmentosa (99-100, 301). Bei diesen Krankheiten sterben Photorezeptoren oder Ganglienzellen, was letztendlich zum Sehverlust bis hin zur vollständigen Erblindung führt.

5.3.1.1 Wirkung von relevanten Faktoren auf die Entwicklung der Photorezeptoren

Im Vergleich zeigten alle verwendeten Faktoren (BDNF, GDNF und PEDF) eine stimulierende Wirkung auf einen der zwei Photorezeptortypen. GDNF fördert die Entwicklung der Stäbchen und zeigte keinen Einfluss auf Zapfen. Die Expression von Rhodopsin wurde um mindestens 1 Tag beschleunigt. Interessant ist, dass der direkte Rezeptor für GDNF (GFR α 1) nicht in Photorezeptoren exprimiert wird, aber in reinen Müllerzell-Populationen. GDNF besitzt allerdings eine geringe Affinität zu GFR α 2, der in Photorezeptoren exprimiert wird (216-217). Die bisherige These für die GDNF-Wirkung auf Photorezeptoren ist, dass der GDNF-Effekt den GFR α 2-Signalweg verwendet oder dass andere Zellen

(Radialgliazellen) auf exogenes GDNF reagieren und die Photorezeptoren beeinflussen (173, 216, 239).

Bei PEDF wurde der gegenteilige Effekt beobachtet. Während die Zapfen eine leicht beschleunigte Entwicklung durch exogenes PEDF erfahren, ist die Stäbchen-Entwicklung stark verzögert. Der Rezeptor für PEDF ist bislang nicht eindeutig identifiziert worden. Eine Studie konnte zeigen, dass PEDF an Zelloberflächenproteine von Pigmentepithelzellen bindet und dass diese Oberflächenproteine zur *patatin-like phospholipase domain-containing 2* (PNPLA2) Familie gehören (135). Im Explantat ist allerdings kein RPE vorhanden, trotzdem hat PEDF einen Effekt auf die Photorezeptoren-Entwicklung. Unter Umständen ist der Rezeptor auch in Müllerzellen exprimiert, nicht aber in Photorezeptoren.

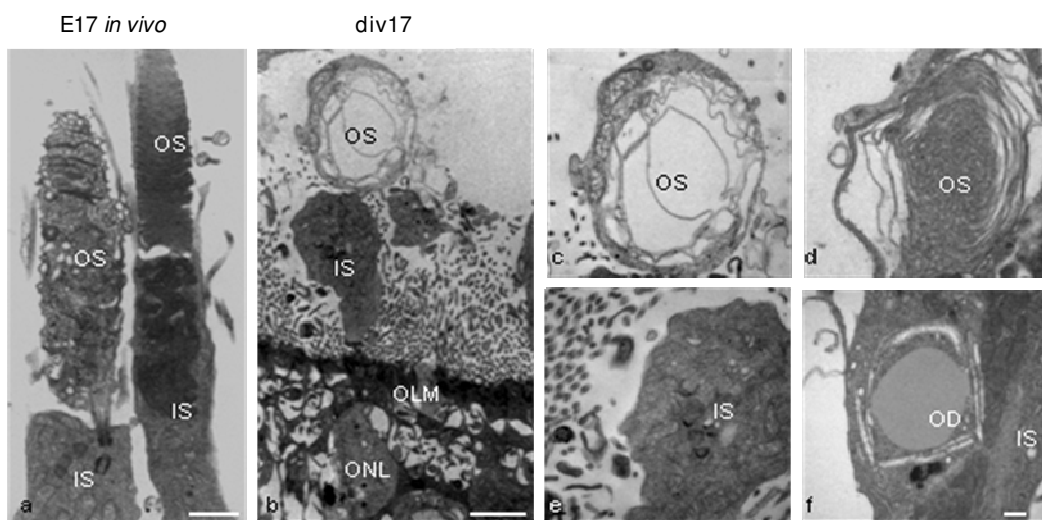


Abbildung 56. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der äußeren Segmente der Photorezeptoren. Bild a zeigt hochauflösende elektronenmikroskopische Aufnahmen von inneren und äußeren Segmenten der Photorezeptoren von E17 *in vivo*-Retina. Bild b zeigt eine Photorezeptorzelle in der ONL mit dem inneren und äußeren Segment in einem Explantat, welches für 17 Tage *in vitro* kultiviert wurde. Die Bilder c und e zeigen die Vergrößerung des inneren und äußeren Segmentes. Es ist darauf hinzuweisen, dass die äußeren Segmente der Explantate keine fein gestapelten Membranen bilden, sondern diffus angeordnete Membranen (c). Die Bilder d und f zeigen weitere äußere und innere Segmente von verschiedenen Explantaten. *In vivo*-ähnliche Membranstapel im Explantat sind in d gezeigt. Ebenfalls sind die Öl-Tröpfchen im inneren Segment eines Photorezeptors im Explantat abgebildet (f). Maßstab: 1 μm (a), 2 μm (b), 0,5 μm (c, d, e und f).

Bei der Entwicklung des Explantatsystems fiel auf, dass die Entfernung des RPEs zu veränderten äußeren Segmenten führt. Die Segmente waren sprichwörtlich 'aufgebläht' und zeigten keine typische laminare Schichtung im äußeren Segment

(Abbildung 56). Der Einsatz von exogenem PEDF zeigt in histologischen Schnitten eine scheinbar frühere Ausprägung der Segmente. Um diese These eindeutig zu bestätigen, sind elektronenmikroskopische Aufnahmen nötig. Aufgrund der Literatur lässt sich dieser Eindruck bestätigen (124). Exogenes PEDF führte zu deutlicher geschichteten äußeren Segmenten in RPE-freien Retina-Explantaten. Allein PEDF, und nicht die stützende Funktion der Pigmentepithel-Zellen, ist für die Morphologie der äußeren Segmente der Photorezeptoren verantwortlich.

Frühere Arbeiten zeigen, dass eine BDNF-Einzelbehandlung keinen Effekt auf Photorezeptoren hat (180). Hierbei werden Rosettensphäroide mit der gleichen BDNF-Konzentration (10 ng/ml) behandelt und zu entsprechenden Stadien auf die Photorezeptoren-Entwicklung untersucht. Die eigenen Ergebnisse bestätigen diese Beobachtungen. Wurde BDNF allerdings in Kombination mit Forskolin eingesetzt, wurde die Entwicklung der Stäbchen beschleunigt. Forskolin stimulierte die Expression des BDNF-Rezeptors TrkB, sodass exogenes BDNF einen stärkeren Einfluss ausüben konnte. Wie bei GDNF, wird der Rezeptor für BDNF nicht in Photorezeptoren exprimiert (89, 109), trotzdem wurde in dieser Arbeit eine frühere Entwicklung der Rhodopsin-Expression in Stäbchen beobachtet. Auch wenn BDNF allein keinen Effekt auf Photorezeptoren hatte, zeigte eine BDNF-Behandlung bei Retina-degenerativen Krankheiten eine Wirkung auf das Überleben der Photorezeptoren. In der Maus wird ein ähnlicher Effekt beschrieben (302). Hier wird eine TrkB *knockout* Maus erstellt und durch Zugabe von Glutamat eine Degeneration der Photorezeptoren induziert. Exogenes BDNF ist nicht in der Lage, das Überleben der Photorezeptoren zu steigern, bei den Kontroll-Mäusen ist das jedoch der Fall. Als möglicher Kandidat kommen die Müllerzellen in Frage, da sie, wie bei GDNF, vermutlich als Vermittler zwischen Wachstumsfaktor und reagierender Zelle (Photorezeptoren) fungieren. Neben der Entwicklungsförderung und dem Schutz gegen Glutamatoxizität zeigt BDNF auch eine schützende Wirkung für das Überleben von Photorezeptoren bei lichtinduziertem Photorezeptor-Zelltod (303) und Retinitis Pigmentosa (304). BDNF hat eine Wirkung auf Photorezeptoren, auch wenn sie indirekt über Müllerzellen erfolgt.

BDNF wird innerhalb der Retina exprimiert und die Expression von BDNF ist sogar unter *in vitro*-Bedingungen gesteigert. Die Expression von TrkB wird unter *in*

vitro-Bedingungen etwas früher induziert (6 Tage früher als *in vivo*), ist aber in den ersten Tagen *in vitro* abwesend (gezeigt für das Explantat und die *in vivo*-Retina). Somit ist der BDNF-Rezeptor TrkB nur begrenzt auf der Ganglienzelloberfläche vorhanden. Hierbei ist nicht auszuschließen, dass andere retinale Zelltypen für die frühe TrkB-Expression verantwortlich sind. Allein die gesteigerte BDNF-Expression unter *in vitro*-Bedingungen ist nicht in der Lage, das Überleben der Ganglienzellen durch die verfügbaren BDNF-Rezeptoren (TrkB) zu gewährleisten. Erst ein Überschuss an BDNF fördert das Überleben der Ganglienzellen. Der Einsatz von 5 μ M Forskolin stimuliert die TrkB-Expression im Explantat (Abbildung 57). Allein durch die Forskolin-Behandlung wurde eine leichte Steigerung des Ganglienzell-Überlebens beobachtet (Diplomarbeit Julia Wiedemann). Forskolin steigert die Wirkung von BDNF, indem die Expression vom BDNF-Rezeptor TrkB steigert. Diese Steigerung hängt mit einer Erhöhung des cAMP-Spiegels zusammen (114-116). BDNF bzw. TrkB wird in der Ratten-Retina von Ganglienzellen, Amakrinzellen und Müllerzellen exprimiert (91-92). Durch die erhöhte Expression von TrkB kann dieses interne BDNF eine Wirkung auf das Überleben der Ganglienzellen haben. Durch die Kombination von BDNF und Forskolin wurde die Zahl an Ganglienzellen im Vergleich zur BDNF-Einzelbehandlung verdoppelt.

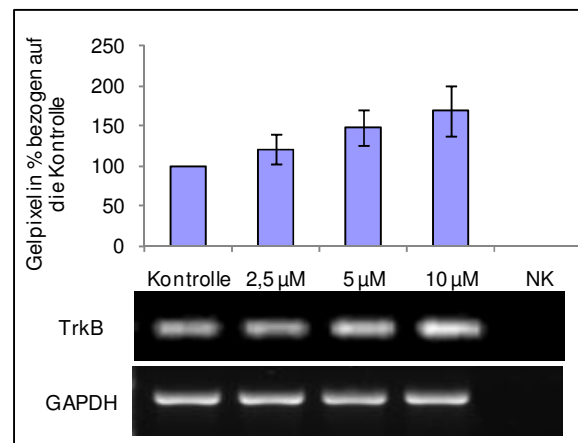


Abbildung 57. Forskolin stimuliert die TrkB-Expression. TrkB-Expression unter verschiedenen Forskolin-Konzentrationen zu div2. Statistische Gelauswertung mit ImageJ. Beachte, dass die TrkB-Expression proportional zur Forskolin-Konzentration steigt. K: Kontrolle, NK: Negativkontrolle. (n = 2) +/- SD.

5.3.1.2 Nur BDNF beschleunigt die gesamte retinale Explantat-Entwicklung

Es ist bekannt, dass ein Faktor in verschiedenen Gewebetypen unterschiedliche Aufgaben erfüllt. Allein die Acetylcholinesterase ist in vielen Geweben und Zelltypen präsent, was nichts mit ihrer klassischen Aufgabe (Abbau vom Neurotransmitter Acetylcholin) zu tun hat (305-306). Wenn die Photorezeptoren

indirekt auf Wachstumsfaktoren reagieren, können auch andere Neuronen stimuliert werden. Bei dieser Fragestellung wurde die Entwicklung der IPL bzw. die Entwicklung der IPL-Subbanden, unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren, studiert. Nur BDNF war in der Lage, die Entwicklung zu beschleunigen. BDNF beschleunigt die Anordnung der SACs an den flankierenden Seiten der IPL und beschleunigt auch die IPL- und Subbanden-Bildung. Einige Arbeiten beschreiben, dass Amakrinzellen den BDNF-Rezeptor TrkB exprimieren (307-308) und dass die ChAT-Expression durch BDNF beeinflusst werden kann (309-310). Auch die Migration der Horizontalzellen wurde durch exogenes BDNF beschleunigt. Forskolin hat auf die beschleunigte Entwicklung der IPL und der Horizontalzellen keine steigernde Wirkung. Offenbar ist mit der einfachen BDNF-Behandlung ein maximaler Effekt in diesem Bereich erzielt worden.

Die Schlussfolgerungen bis zu diesem Zeitpunkt sind, dass alle drei Faktoren (BDNF, GDNF und PEDF) eine Wirkung auf die Entwicklung der Photorezeptoren haben, aber nur BDNF erzielt auch auf andere Strukturen der Retina eine Wirkung. Neben der klassischen überlebenssteigernden Wirkung auf Ganglienzellen, stimuliert BDNF auch die Entwicklung der IPL und die Migration der Horizontalzellen. Forskolin erwies sich im Fall des Ganglienzell-Überlebens und besonders bei der Photorezeptor-Entwicklung als wirkungssteigernde Substanz. Unter Berücksichtigung der Literatur wird deutlich, dass BDNF und GDNF nur indirekt, mit einem anderen Zelltyp als Vermittler, auf Photorezeptoren wirken. Sowohl GFR α 1 (GDNF-Rezeptor) als auch TrkB (BDNF-Rezeptor) werden nicht in Photorezeptoren exprimiert. Als Kandidat für die Effektvermittlung kommen in erster Linie die Radialgliazellen (für das Huhn Müllerzellen) in Frage, da sie mit allen retinalen Neuronen in direktem Kontakt stehen und mit ihnen kommunizieren. Inwieweit die Müllerzellen in der Lage sind, auf exogene Faktoren zu reagieren, ist die Hauptfragestellung des nächsten Kapitels.

5.3.1.3 Beeinflussen Wachstumsfaktoren das Expressionsmuster in Müllerzellen?

Reine Müllerzell-Populationen weisen eine reduzierte GS-Expression auf. Die GS-Expression ist dabei abhängig vom direkten Zellkontakt zu Photorezeptoren (siehe auch Abschnitt 5.1.4). Der Müllerzell-Monolayer bot eine ideale Plattform, um die

Wirkung der Wachstumsfaktoren auf die Differenzierung der Müllerzellen zu beobachten. Bei den immunhistochemischen Färbungen und Expressionsstudien wurde nur auf mRNA-Ebene ein Effekt von Zytokinen auf die GS-Expression festgestellt. GDNF und BDNF/Forskolin hatten die Expression der GS gesteigert. Dai *et al.* zeigen, dass BDNF in der Lage ist, die GS-Expression in Müllerzellen der Ratten-Retina zu stimulieren (311). PEDF hat ebenfalls eine Wirkung auf die GS-Expression. Bei Diabetes und hohen Glukose-Konzentrationen wird die Konzentration von Interleukin-1 β gesteigert und die Expression von PEDF und GS gesenkt. Zugefügtes PEDF steigert die Expression von GS auf ein normales Niveau der Kontrolle (312-313). Von einem PEDF-Einfluss auf die GS-Expression in Kontrollkulturen wird nicht berichtet. Auch in dieser Arbeit war die GS-Expression von exogenem PEDF unbeeinflusst.

Reine Hühner-Müllerzell-Populationen sind in der Lage, auf Zytokine zu reagieren und einige stimulieren die Expression von GS. Es stellte sich die Frage, inwieweit exogene Faktoren einen Einfluss auf die Expression von Zytokinen und ihren Rezeptoren haben. Es wurde gezeigt, dass GDNF seine eigene Expression und die seines direkten Rezeptors (GFR α 1) steigert. Forskolin steigert auch die Expression von BDNF und TrkB. Das beweist, dass Müllerzellen in gleicher Weise auf Forskolin reagieren, ebenso wie für das gesamte Explantat gezeigt. Interessant ist, dass eine Forskolin-Behandlung die Expression von GDNF und GFR α 1 ebenfalls fördert. Die Expression für GDNF und GFR α 1 scheint von GDNF und Forskolin so spezifisch angesprochen zu werden, dass die Expression von GFR α 2 nicht auf GDNF oder Forskolin reagiert. Interessant ist auch, dass Forskolin in Kombination mit BDNF nur die TrkB-Expression steigert, aber nicht die von BDNF. Nur wenn Forskolin ohne BDNF zu den Müllerzellen zugegeben wurde, steigt auch die BDNF-Expression. In dieser Arbeit wurde eindeutig gezeigt:

1. Forskolin steigert nicht nur die TrkB-Expression, sondern auch die von GDNF, GFR α 1 und BDNF.
2. Sämtliche Arbeitsgruppen, die Forskolin und TrkB untersucht haben, arbeiteten mit Gehirngewebe oder mit der gesamten Retina. Forskolin zeigt auch in reinen Müllerzellen eine Steigerung der TrkB-Expression.
3. Die BDNF-Expression scheint sich selbst zu regulieren, wenn BDNF im Überschuss vorhanden ist.
4. Ist BDNF im Überschuss vorhanden, kann die BDNF-Expression nicht durch Forskolin stimuliert werden.

Genau wie GDNF steigert auch PEDF seine eigene Expression. PEDF hat auf andere Gene allerdings in Müllerzellen keinen Einfluss. Auch EGF und FGF spielen für die Expression der anderen untersuchten Gene keine Rolle. Vimentin und Katalase sind in Müllerzellen unter dem Einfluss von den verschiedenen Wachstumsfaktoren stabil exprimiert. Katalase dient in dieser Arbeit als Stress-Marker. Eine erhöhte Expression der Katalase verweist auf ein erhöhtes Vorkommen reaktiver Sauerstoff-Spezies. Im Fall der Katalase-Expression wird durch Zugabe der Wachstumsfaktoren kein zusätzlicher Stress (oxidativen Stress) induziert, da keine Veränderung in der Katalase-Expression vorliegt.

5.3.2 Helfen Wachstumsfaktoren gegen die α -Aminoadipat-(AAA)-Gliose?

In keiner bekannten Arbeit wurde versucht, die Müllerzell-Gliose mit BDNF, GDNF und PEDF zu behandeln, oder über AAA eine Gliose zu induzieren und zu studieren. In dieser Arbeit wurden Explantate mit 1 mM AAA behandelt und gleichzeitig einer der drei relevanten Wachstumsfaktoren dazugegeben. BDNF und GDNF waren nicht in der Lage, die Wirkung von AAA zu unterdrücken. In beiden Behandlungsformen schollen die Müllerzellen gliotisch an und zeigten alle beschriebenen Auswirkungen von AAA auf die Entwicklung des Explantates (fehlende Subbanden in der IPL, aufgelöste ONL und OLM). Lediglich in der TUNEL-Färbung zeigt BDNF eine Wirkung auf das Absterben der Ganglienzellen und GDNF eine Reduktion auf die Phase des Absterbens der Photorezeptoren in der ONL am Tag 6. Die gliotische Struktur der Müllerzellen wird durch BDNF und GDNF nicht reduziert.

5.3.2.1 PEDF reduziert die α -Aminoadipat (AAA)-Gliose in histologischen Befunden

PEDF nimmt in dieser Reihe von Experimenten eine Sonderstellung ein, denn PEDF war tatsächlich in der Lage, die durch AAA induzierte gliotische Pathologie der Müllerzellen zu reduzieren. Unter AAA-Einfluss zogen die Müllerzellen ihre Zellfortsätze zurück und der Zellkörper in der INL scholl an. Durch den größeren Platzbedarf der Müllerzellen wurden die Neuronen zur Seite gedrückt und es entstand ein 'Riss' in der INL. Die Zellfortsätze der Müllerzellen zogen sich unter

AAA-Einfluss, besonders auf der apikalen Seite der Retina, zurück. Die Photorezeptoren erschienen unorganisiert und missgebildet. PEDF reduzierte auf allen untersuchten Ebenen die Auswirkungen von AAA. Die Zellfortsätze der Müllerzellen erschienen wesentlich gestreckter und auch eine hohe Organisation der ONL war wieder hergestellt. Selbst die IPL-Subbanden waren durch das zusätzliche exogene PEDF teilweise unangetastet (ChAT/AChE-Immunfärbung). In der Karnovsky-Roads-Färbung reduzierte AAA die AChE-Aktivität in den IPL-Subbanden a und d. PEDF bewirkte einen *rescue* dieser AChE-Aktivität. PEDF reduzierte insgesamt die Müllerzell-Gliose. Es können keine Aussagen über eine direkte oder indirekte PEDF-Wirkung auf bestimmte Zelltypen getroffen werden. PEDF wurde in den Müllerzellen, der ONL und der GCL exprimiert. Der Rezeptor für PEDF ist allerdings nicht eindeutig identifiziert (133, 279). Ein möglicher Rezeptor für PEDF wird im okularen Gewebe des retinalen Pigmentepithels (RPEs) und an retinalen Oberflächen gefunden (135). Nähere Angaben, in welchen retinalen Schichten der Rezeptoren zu finden sind, fehlen.

Auf Expressionsebene wurde gezeigt, dass PEDF seine eigene Expression in Müllerzellen stimuliert. Exogenes PEDF ist allerdings nicht in der Lage, seine Expression unter dem Einfluss von AAA zu stimulieren, darüber hinaus reduziert eine AAA-Behandlung die PEDF-Expression. Somit sind sämtliche Reduktionen der AAA-Effekte auf exogenes PEDF zurückzuführen. Desweiteren scheint PEDF eine entscheidende Schlüsselrolle im gliotischen Mechanismus zu spielen. Zhu *et al.* (2009) verdeutlichen, dass die PEDF-Expression sich in Abhängigkeit zum vorherrschenden oxidativen Stress reduziert (314). Die Arbeitsgruppe zeigt anhand von verschiedenen pH-Werten (7,2 - 6,5) einen Anstieg der PEDF-Expression in Abhängigkeit zum sinkenden pH-Wert. Daraus entstand die Vermutung, dass bei einem steigenden pH-Wert die PEDF-Expression sinkt. In dieser Arbeit konnte diese Vermutung bestätigt werden. Eine vergleichbare Behandlung von PEDF unter dem Einfluss von AAA ist in der Literatur bislang nicht unternommen worden.

5.3.2.2 Normale GFAP-Expression im α -Aminoadipat-(AAA)-Gliosemodell durch PEDF

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) wird nur unter Stressbedingungen, wie der Gliose, in Müllerzellen exprimiert (12, 56-58). AAA erzeugte eine Gliose, was sich durch eine Induktion der GFAP-Expression bestätigen ließ. PEDF reduzierte das gliotische Anschwellen der Müllerzellen und den oxidativen Stress durch AAA. PEDF war auch in der Lage, die Expression von GFAP zu normalisieren. Somit zeigt PEDF auf sämtlichen Ebenen eine Wirkung auf die AAA-Gliose. Die Funktionsweise von PEDF ist nicht zu ermitteln, da die Rezeptoren für PEDF noch nicht identifiziert wurden. Eine Identifikation eines PEDF-Rezeptors in Müllerzellen würde Aufschluss über den Wirkungsmechanismus hinsichtlich des AAA-induzierten oxidativen Stress und der GFAP-Expression geben.

5.3.2.3 PEDF verringert die stark gliatoxischen Eigenschaften von α -Aminoadipat (AAA) auch bei späterer AAA-Behandlung.

AAA zeigt eine stärkere Müllerzell-Toxizität bei weiter entwickelten retinalem Gewebe im Explantat. Der Grund dieses Befundes bleibt spekulativ. Möglicherweise besitzen frühe Müllerzellen einen Signalweg/Mechanismus, der den oxidativen Stress abwendet. Darüber hinaus wird dieser 'schützende Weg' durch die Anwesenheit von AAA länger aufrecht erhalten, da Explantate wesentlich länger eine gewisse Struktur aufrecht erhalten als Explantate, die zum späteren Stadium mit AAA behandelt wurden. PEDF zeigt auch bei einer späteren AAA-Behandlung (ab Tag 6 *in vitro*) eine deutlichere Verringerung der Müllerzell-Gliose. In den verschiedenen Färbungen erscheinen die Müllerzellen deutlich gestreckter (GS- und Vimentin-Färbung) und die ONL (F11) bzw. die Ausrichtung der Photorezeptoren (CERN 906) sind im Wesentlichen mit der Kontrolle vergleichbar.

5.3.2.4 PEDF reduziert den oxidativen Stress bei der α -Aminoadipat-(AAA)-Gliose

Über den Katalase-Test wurde in dieser Arbeit der oxidative Stress in der Hühnerretina durch AAA nachgewiesen. Exogenes PEDF reduziert die Wirkung

von AAA auf die ONL, INL und IPL. Mit Hilfe des Katalase-Tests konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass exogenes PEDF eine deutliche Reduktion des oxidativen Stresses hervorruft. Auch in der TUNEL-Färbung kann statistisch eine Reduktion des Zelltodes in der INL nachgewiesen werden. Zhang *et al.* (2010) zeigen, dass hohe Glutamat-Konzentrationen die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) steigern (146). In einer anderen Arbeit wird von einer vergleichbaren Wirkung berichtet (147). Hier wird die Retina von postnatalen Ratten mit H₂O₂ behandelt. Diese Behandlung erzeugt oxidativen Stress, welcher den Zelltod induziert. Exogenes 100 ng/ml PEDF ist in der Lage den Zelltod zu reduzieren. Die Behandlung mit Wasserstoffperoxid wirkt auf alle Zellen in Kultur gleichermaßen. Die vorliegende Arbeit zeigte, dass PEDF speziell auf Müllerzellen eine antioxidative Wirkung hatte. AAA wirkte speziell auf Gliazellen toxisch und zwar durch Blockierung antioxidativer Mechanismen in den Gliazellen (siehe Abschnitte 5.2.6). Allein 50 ng/ml PEDF war in der Lage, den oxidativen Stress in Müllerzellen stark zu senken. Mit diesen Experimenten wurde gezeigt, dass PEDF in der Lage ist, die Gliose aufzuhalten. Die Gliose ist eine Begleiterscheinung, die bei vielen Retina-Erkrankungen und Stressbedingungen vorkommt. Weitere Studien an Retina-degenerativen Krankheitsmodellen könnten zeigen, dass PEDF auch hier zu einer Verbesserung der Gliose führt und somit den Therapieerfolg steigern könnte.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von relevanten Zytokinen (BDNF, GDNF und PEDF) auf die gesamte retinale Entwicklung und auf reine Müllerzell-Populationen zu studieren und diese Faktoren auf ein etabliertes Gliosemodell anzuwenden. Neben einem schnelleren Weg, reine Müllerzell-Populationen zu erstellen, wurde für diese Arbeit ein Explantatsystem entwickelt, das sämtliche Entwicklungsschritte entsprechend der *in vivo*-Retina durchläuft.

Die Gliose im Explantatsystem wurde mit DL- α -Aminoadipat (AAA) erzeugt. AAA ist ein Toxin, das speziell nur auf Gliazellen wirkt. Neben einem Anschwellen wiesen die Müllerzellen eine GFAP-Expression auf, die nur unter Stressbedingungen (Gliose) vorkommt. Beide Reaktionen sind wichtige Nachweise für eine Gliose. Mittels Katalase-Test wurde gezeigt, dass die AAA-Gliose durch oxidativen Stress erzeugt wird und zum Absterben der Müllerzellen führt.

Um der Frage nachzugehen, inwieweit Müllerzellen unter gliotischen Bedingungen auf relevante Faktoren reagieren können, musste ein schnellerer Weg gefunden werden, um reine Müllerzell -Populationen für molekularbiologische Untersuchungen zu erstellen. Hohe Ascorbat-Konzentrationen entwickeln eine neurotoxische Wirkung, mit der es möglich war, reine Müllerzell-Populationen über Nacht zu erstellen. Die Expressionsstudien zeigten, dass Müllerzellen die genannten Faktoren und ihre Rezeptoren unter Kontrollbedingungen exprimierten und auch auf exogene Faktoren reagierten. Alle exogenen Faktoren stimulierten in Müllerzellen ihre eigene Expression und zum Teil auch ihrer Rezeptoren. Bei dieser Studie wurde auch eine stimulierende Wirkung von Forskolin auf die TrkB-Expression in Müllerzellen nachgewiesen, die bislang nur für die gesamte Retina gezeigt wurde. Die Expression der besagten Zytokine wurde unter dem Einfluss von AAA dramatisch beeinflusst. GDNF, GFR α 1, TrkB und PEDF wiesen schon bei relativ geringen AAA-Konzentrationen eine starke Verringerung der Genexpression auf. Somit wurden sämtliche betrachteten Signalwege unter gliotischen Bedingungen beeinträchtigt.

Unter Kontrollbedingungen förderten diese Faktoren – vermittelt durch Müllerzellen - die Entwicklung der Photorezeptoren. Die Photorezeptoren weisen dabei keine Expression für diese Zytokine auf. Hieraus wird deutlich, dass gliotische Bedingungen wichtige Müllerzell-Signale unterbinden, die für den Erhalt der umliegenden Neuronen wichtig sind.

Alle verwendeten Faktoren können auf Müllerzellen einwirken, dennoch zeigte nur PEDF eine reduzierende Wirkung auf die AAA-Gliose. Die vorliegende Arbeit zeigt eine Reduktion des gliotischen Anschwellens und der GFAP-Expression durch exogenes PEDF unter AAA-Einfluss. Auch im Katalase-Test wurde eine Reduktion des AAA-induzierten oxidativen Stresses beobachtet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, dass Müller'sche Radialgliazellen auf exogene Faktoren reagieren und einen entscheidenden Beitrag bei der Vermittlung von Zytokinwirkungen haben. Eine Beeinträchtigung der Müllerzellen durch AAA führt nicht nur zum Verlust der retinalen Struktur, sondern auch zu einem dramatisch veränderten Expressionsverhalten. Das Absterben der Neuronen bei Retina-degenerativen Krankheiten kann somit durch fehlende Müller'sche Signale in gliotischen Müllerzellen unterstützt werden. Allein PEDF war in der Lage, auf die Gliose positiv einzuwirken und den Zerfall der Retina zu reduzieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit erweitern das Verständnis von Gliosen und der Degeneration von Neuronen. Dies könnte die Therapie retinaler Erkrankungen entscheidend unterstützen, indem eine Gliose durch PEDF unterbunden wird. Weitere Studien müssen zeigen, welche Wirkung PEDF im entsprechenden Retina-degenerativen Tiermodell hat, und ob allein eine verminderte Gliose einen positiven Einfluß auf den Krankheitsverlauf hat.

7 Literatur

1. Mey, J., and Thanos, S. (2000) Development of the visual system of the chick. I. Cell differentiation and histogenesis, *Brain Res Brain Res Rev* 32, 343-379.
2. Fischer, A. J., and Reh, T. A. (2000) Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens, *Dev Biol* 220, 197-210.
3. Prada, C., Puga, J., Perez-Mendez, L., Lopez, R., and Ramirez, G. (1991) Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina, *Eur J Neurosci* 3, 559-569.
4. Belecky-Adams, T., Cook, B., and Adler, R. (1996) Correlations between terminal mitosis and differentiated fate of retinal precursor cells in vivo and in vitro: analysis with the "window-labeling" technique, *Dev Biol* 178, 304-315.
5. Adler, R. (2000) A model of retinal cell differentiation in the chick embryo, *Prog Retin Eye Res* 19, 529-557.
6. Bear, M., Connors, B., and Paradiso, M. (2006) *Neuroscience*. New York: Lippincott.
7. Reichenbach, A., Fromter, C., Engelmann, R., Wolburg, H., Kasper, M., and Schnitzer, J. (1995) Muller glial cells of the tree shrew retina, *J Comp Neurol* 360, 257-270.
8. Callaway, E. M. (2005) Structure and function of parallel pathways in the primate early visual system, *J Physiol* 566, 13-19.
9. Lemke, G., and Reber, M. (2005) Retinotectal mapping: new insights from molecular genetics, *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 551-580.
10. Nakazawa, T., Tachi, S., Aikawa, E., and Ihnuma, M. (1993) Formation of the myelinated nerve fiber layer in the chicken retina, *Glia* 8, 114-121.
11. Fischer, A. J., and Reh, T. A. (2003) Potential of Muller glia to become neurogenic retinal progenitor cells, *Glia* 43, 70-76.
12. Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S. N., Osborne, N. N., and Reichenbach, A. (2006) Muller cells in the healthy and diseased retina, *Prog Retin Eye Res* 25, 397-424.
13. Reinicke, M. (1995) Der Beitrag von Müller-Gliazellen zum Strukturaufbau und Erhalt der Retina, *Dissertation an der TU Darmstadt*.
14. Willbold, E., Brummendorf, T., Rathjen, F. G., Schwarz, H., and Weiss, B. (1997) The neural cell recognition molecule F11 is expressed on Muller cells and Schwann cells in vitro, *J Hirnforsch* 38, 71-80.
15. Willbold, E., Reinicke, M., Lance-Jones, C., Lagenaur, C., Lemmon, V., and Layer, P. G. (1995) Muller glia stabilizes cell columns during retinal development: lateral cell migration but not neuropil growth is inhibited in mixed chick-quail retinospheroids, *Eur J Neurosci* 7, 2277-2284.
16. Stier, H., and Schlosshauer, B. (1998) Different cell surface areas of polarized radial glia having opposite effects on axonal outgrowth, *Eur J Neurosci* 10, 1000-1010.
17. Schlosshauer, B., Bauch, H., and Stier, H. (1997) Photoreceptor differentiation analyzed by the novel monoclonal antibody 1G1, *Eur J Cell Biol* 73, 150-157.

18. Thangaraj, G. (2012) On Roles of Cholinergic Amacrine and Müller Glial Cells in the Development of Networks in the inner Plexiform Layer of the Chick Retina, *Dissertation an der TU Darmstadt*.
19. Turner, D. L., and Cepko, C. L. (1987) A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development, *Nature* 328, 131-136.
20. Turner, D. L., Snyder, E. Y., and Cepko, C. L. (1990) Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina, *Neuron* 4, 833-845.
21. Holt, C. E., Bertsch, T. W., Ellis, H. M., and Harris, W. A. (1988) Cellular determination in the *Xenopus* retina is independent of lineage and birth date, *Neuron* 1, 15-26.
22. Wurm, A., Iandiev, I., Uhlmann, S., Wiedemann, P., Reichenbach, A., Bringmann, A., and Pannicke, T. (2011) Effects of ischemia-reperfusion on physiological properties of Müller glial cells in the porcine retina, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 3360-3367.
23. Lewis, G. P., and Fisher, S. K. (2003) Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression, *Int Rev Cytol* 230, 263-290.
24. Puro, D. G., and Stuenkel, E. L. (1995) Thrombin-induced inhibition of potassium currents in human retinal glial (Müller) cells, *J Physiol* 485 (Pt 2), 337-348.
25. Sarthy, P. V. (1985) Establishment of Müller cell cultures from adult rat retina, *Brain Res* 337, 138-141.
26. Lewis, G. P., Erickson, P. A., Guerin, C. J., Anderson, D. H., and Fisher, S. K. (1992) Basic fibroblast growth factor: a potential regulator of proliferation and intermediate filament expression in the retina, *J Neurosci* 12, 3968-3978.
27. Fischer, A. J., McGuire, C. R., Dierks, B. D., and Reh, T. A. (2002) Insulin and fibroblast growth factor 2 activate a neurogenic program in Müller glia of the chicken retina, *J Neurosci* 22, 9387-9398.
28. Fischer, A. J., and Reh, T. A. (2001) Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina, *Nat Neurosci* 4, 247-252.
29. Bahr, M., and Schlosshauer, B. (1989) JONES ganglioside expression on retinal glia increases after axotomy, *J Neurocytol* 18, 553-563.
30. Bonaventure, N., Roussel, G., and Wioland, N. (1981) Effects of DL-alpha-amino adipic acid on Müller cells in frog and chicken retinae in vivo: relation to ERG b wave, ganglion cell discharge and tectal evoked potentials, *Neurosci Lett* 27, 81-87.
31. Olney, J. W., Ho, O. L., and Rhee, V. (1971) Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system, *Exp Brain Res* 14, 61-76.
32. Xu, H., Andi, B., Qian, J., West, A. H., and Cook, P. F. (2006) The alpha-amino adipate pathway for lysine biosynthesis in fungi, *Cell Biochem Biophys* 46, 43-64.
33. Bridges, R. J., Hatalski, C. G., Shim, S. N., Cummings, B. J., Vijayan, V., Kundi, A., and Cotman, C. W. (1992) Gliotoxic actions of excitatory amino acids, *Neuropharmacology* 31, 899-907.

34. Sugawara, K., Torigoe, K., Okoyama, S., Negishi, K., and Kato, S. (1990) Neurotoxic effects of L-alpha-amino adipic acid on the carp retina: a long term observation, *Neuroscience* 36, 155-163.
35. Garthwaite, J., and Regan, C. M. (1980) Toxic effects of alpha-amino adipate on cultured cerebellar cells, *Brain Res* 194, 603-607.
36. Olney, J. W., de Gubareff, T., and Collins, J. F. (1980) Stereospecificity of the gliotoxic and anti-neurotoxic actions of alpha-amino adipate, *Neurosci Lett* 19, 277-282.
37. Casper, D. S., and Reif-Lehrer, L. (1983) Effects of alpha-amino adipate isomers on the morphology of the isolated chick embryo retina, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24, 1480-1488.
38. McBean, G. J. (1994) Inhibition of the glutamate transporter and glial enzymes in rat striatum by the gliotoxin, alpha amino adipate, *Br J Pharmacol* 113, 536-540.
39. Brown, D. R., and Kretzschmar, H. A. (1998) The gliotoxic mechanism of alpha-amino adipic acid on cultured astrocytes, *J Neurocytol* 27, 109-118.
40. Kato, S., Mawatari, M., Sugitani, K., and Yasui, Y. (1996) DL- α -amino adipate is a Toxin to Müller Cells, *Progress in Retinal and Eye Research* 15, 435-456.
41. Faivre-Bauman, A., Rossier, J., and Benda, P. (1974) Glutamate accumulation by a clone of glial cells, *Brain Res* 76, 371-375.
42. Henn, F. A., Goldstein, M. N., and Hamberger, A. (1974) Uptake of the neurotransmitter candidate glutamate by glia, *Nature* 249, 663-664.
43. Balcar, V. J., Borg, J., and Mandel, P. (1977) High affinity uptake of L-glutamate and L-aspartate by glial cells, *J Neurochem* 28, 87-93.
44. Gordon, R. D., and Balazs, R. (1983) Characterization of separated cell types from the developing rat cerebellum: transport of glutamate and aspartate by preparations enriched in Purkinje cells, granule neurones, and astrocytes, *J Neurochem* 40, 1090-1099.
45. Drejer, J., Larsson, O. M., and Schousboe, A. (1982) Characterization of L-glutamate uptake into and release from astrocytes and neurons cultured from different brain regions, *Exp Brain Res* 47, 259-269.
46. Huck, S., Grass, F., and Hortnagl, H. (1984) The glutamate analogue alpha-amino adipic acid is taken up by astrocytes before exerting its gliotoxic effect in vitro, *J Neurosci* 4, 2650-2657.
47. Pannicke, T., Stabel, J., Heinemann, U., and Reichelt, W. (1994) alpha-Amino adipic acid blocks the Na(+)-dependent glutamate transport into acutely isolated Muller glial cells from guinea pig retina, *Pflugers Arch* 429, 140-142.
48. Kato, S., Ishita, S., Sugawara, K., and Mawatari, K. (1993) Cystine/glutamate antiporter expression in retinal Muller glial cells: implications for DL-alpha-amino adipate toxicity, *Neuroscience* 57, 473-482.
49. Reichelt, W., Stabel-Burow, J., Pannicke, T., Weichert, H., and Heinemann, U. (1997) The glutathione level of retinal Muller glial cells is dependent on the high-affinity sodium-dependent uptake of glutamate, *Neuroscience* 77, 1213-1224.
50. Sagara, J., Miura, K., and Bannai, S. (1993) Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture and in suspension, *J Neurochem* 61, 1667-1671.

-
51. Sagara, J. I., Miura, K., and Bannai, S. (1993) Maintenance of neuronal glutathione by glial cells, *J Neurochem* 61, 1672-1676.
 52. Raps, S. P., Lai, J. C., Hertz, L., and Cooper, A. J. (1989) Glutathione is present in high concentrations in cultured astrocytes but not in cultured neurons, *Brain Res* 493, 398-401.
 53. Bignami, A., and Dahl, D. (1979) The radial glia of Muller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein, *Exp Eye Res* 28, 63-69.
 54. Erickson, P. A., Fisher, S. K., Guerin, C. J., Anderson, D. H., and Kaska, D. D. (1987) Glial fibrillary acidic protein increases in Muller cells after retinal detachment, *Exp Eye Res* 44, 37-48.
 55. Eisenfeld, A. J., Bunt-Milam, A. H., and Sarthy, P. V. (1984) Muller cell expression of glial fibrillary acidic protein after genetic and experimental photoreceptor degeneration in the rat retina, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25, 1321-1328.
 56. Fletcher, E. L., Phipps, J. A., and Wilkinson-Berka, J. L. (2005) Dysfunction of retinal neurons and glia during diabetes, *Clin Exp Optom* 88, 132-145.
 57. Grosche, J., Hartig, W., and Reichenbach, A. (1995) Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), glutamine synthetase (GS), and Bcl-2 protooncogene protein by Muller (glial) cells in retinal light damage of rats, *Neurosci Lett* 185, 119-122.
 58. Dyer, M. A., and Cepko, C. L. (2000) Control of Muller glial cell proliferation and activation following retinal injury, *Nat Neurosci* 3, 873-880.
 59. Huck, S., Grass, F., and Hatten, M. E. (1984) Gliotoxic effects of alpha-amino adipic acid on monolayer cultures of dissociated postnatal mouse cerebellum, *Neuroscience* 12, 783-791.
 60. Reichenbach, A., and Wohlrab, F. (1985) Effects of alpha-amino adipic acid on the glutamate-isolated P III of the rabbit electroretinogram, *Doc Ophthalmol* 59, 359-364.
 61. Karlsen, R. L. (1978) The toxic effect of sodium glutamate and DL-alpha-amino adipic acid on rat retina: changes in high affinity uptake of putative transmitters, *J Neurochem* 31, 1055-1061.
 62. Pedersen, O. O., and Karlsen, R. L. (1979) Destruction of Muller cells in the adult rat by intravitreal injection of D,L-alpha-amino adipic acid. An electron microscopic study, *Exp Eye Res* 28, 569-575.
 63. Linser, P. J., and Moscona, A. A. (1981) Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina: its suppression by the gliatoxic agent alpha-amino adipic acid, *Brain Res* 227, 103-119.
 64. West, E. L., Pearson, R. A., Tschernutter, M., Sowden, J. C., MacLaren, R. E., and Ali, R. R. (2008) Pharmacological disruption of the outer limiting membrane leads to increased retinal integration of transplanted photoreceptor precursors, *Exp Eye Res* 86, 601-611.
 65. Rich, K. A., Figueroa, S. L., Zhan, Y., and Blanks, J. C. (1995) Effects of Muller cell disruption on mouse photoreceptor cell development, *Exp Eye Res* 61, 235-248.
 66. Hauck, S. M., Suppmann, S., and Ueffing, M. (2003) Proteomic profiling of primary retinal Muller glia cells reveals a shift in expression patterns upon adaptation to in vitro conditions, *Glia* 44, 251-263.
-

67. Rothermel, A., and Layer, P. G. (2001) Photoreceptor plasticity in reaggregates of embryonic chick retina: rods depend on proximal cones and on tissue organization, *Eur J Neurosci* 13, 949-958.
68. Steinberg, M. S. (1970) Does differential adhesion govern self-assembly processes in histogenesis? Equilibrium configurations and the emergence of a hierarchy among populations of embryonic cells, *J Exp Zool* 173, 395-433.
69. Ben-Shaul, Y., and Moscona, A. A. (1975) Scanning electron microscopy of aggregating embryonic neural retina cells, *Exp Cell Res* 95, 191-204.
70. Vollmer, G., Layer, P. G., and Gierer, A. (1984) Reaggregation of embryonic chick retina cells: pigment epithelial cells induce a high order of stratification, *Neurosci Lett* 48, 191-196.
71. Thangaraj, G., Greif, A., and Layer, P. G. (2011) Simple explant culture of the embryonic chicken retina with long-term preservation of photoreceptors, *Exp Eye Res* 93, 556-564.
72. Wetts, R., and Fraser, S. E. (1988) Multipotent precursors can give rise to all major cell types of the frog retina, *Science* 239, 1142-1145.
73. Ogilvie, J. M., Speck, J. D., and Lett, J. M. (2000) Growth factors in combination, but not individually, rescue rd mouse photoreceptors in organ culture, *Exp Neurol* 161, 676-685.
74. Thoenen, H. (1991) The changing scene of neurotrophic factors, *Trends Neurosci* 14, 165-170.
75. Zhang, Z., Miyoshi, Y., Lapchak, P. A., Collins, F., Hilt, D., Lebel, C., Kryscio, R., and Gash, D. M. (1997) Dose response to intraventricular glial cell line-derived neurotrophic factor administration in parkinsonian monkeys, *J Pharmacol Exp Ther* 282, 1396-1401.
76. Saarma, M., and Sariola, H. (1999) Other neurotrophic factors: glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), *Microsc Res Tech* 45, 292-302.
77. Siegel, G. J., and Chauhan, N. B. (2000) Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain, *Brain Res Brain Res Rev* 33, 199-227.
78. Bohn, M. C. (2000) Parkinson's disease: a neurodegenerative disease particularly amenable to gene therapy, *Mol Ther* 1, 494-496.
79. Faktorovich, E. G., Steinberg, R. H., Yasumura, D., Matthes, M. T., and LaVail, M. M. (1990) Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor, *Nature* 347, 83-86.
80. Faktorovich, E. G., Steinberg, R. H., Yasumura, D., Matthes, M. T., and LaVail, M. M. (1992) Basic fibroblast growth factor and local injury protect photoreceptors from light damage in the rat, *J Neurosci* 12, 3554-3567.
81. Steinberg, R. H. (1994) Survival factors in retinal degenerations, *Curr Opin Neurobiol* 4, 515-524.
82. Soppet, D., Escandon, E., Maragos, J., Middlemas, D. S., Reid, S. W., Blair, J., Burton, L. E., Stanton, B. R., Kaplan, D. R., Hunter, T., Nikolics, K., and Parada, L. F. (1991) The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor, *Cell* 65, 895-903.
83. Klein, R., Jing, S. Q., Nanduri, V., O'Rourke, E., and Barbacid, M. (1991) The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor, *Cell* 65, 189-197.

-
84. Berkemeier, L. R., Winslow, J. W., Kaplan, D. R., Nikolics, K., Goeddel, D. V., and Rosenthal, A. (1991) Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB, *Neuron* 7, 857-866.
 85. Squinto, S. P., Stitt, T. N., Aldrich, T. H., Davis, S., Bianco, S. M., Radziejewski, C., Glass, D. J., Masiakowski, P., Furth, M. E., Valenzuela, D. M., and et al. (1991) trkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor, *Cell* 65, 885-893.
 86. Cordon-Cardo, C., Tapley, P., Jing, S. Q., Nanduri, V., O'Rourke, E., Lamballe, F., Kovary, K., Klein, R., Jones, K. R., Reichardt, L. F., and et al. (1991) The trk tyrosine protein kinase mediates the mitogenic properties of nerve growth factor and neurotrophin-3, *Cell* 66, 173-183.
 87. Bothwell, M. (1995) Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors, *Annu Rev Neurosci* 18, 223-253.
 88. Chao, M. V. (1994) The p75 neurotrophin receptor, *J Neurobiol* 25, 1373-1385.
 89. Cellierino, A., and Kohler, K. (1997) Brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin-4 receptor TrkB is localized on ganglion cells and dopaminergic amacrine cells in the vertebrate retina, *J Comp Neurol* 386, 149-160.
 90. Hallbook, F., Backstrom, A., Kullander, K., Ebendal, T., and Carri, N. G. (1996) Expression of neurotrophins and trk receptors in the avian retina, *J Comp Neurol* 364, 664-676.
 91. Seki, M., Tanaka, T., Sakai, Y., Fukuchi, T., Abe, H., Nawa, H., and Takei, N. (2005) Muller Cells as a source of brain-derived neurotrophic factor in the retina: noradrenaline upregulates brain-derived neurotrophic factor levels in cultured rat Muller cells, *Neurochem Res* 30, 1163-1170.
 92. Asai, N., Abe, T., Saito, T., Sato, H., Ishiguro, S., and Nishida, K. (2007) Temporal and spatial differences in expression of TrkB isoforms in rat retina during constant light exposure, *Exp Eye Res* 85, 346-355.
 93. Takei, N., Numakawa, T., Kozaki, S., Sakai, N., Endo, Y., Takahashi, M., and Hatanaka, H. (1998) Brain-derived neurotrophic factor induces rapid and transient release of glutamate through the non-exocytotic pathway from cortical neurons, *J Biol Chem* 273, 27620-27624.
 94. Kaplan, D. R., and Miller, F. D. (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system, *Curr Opin Neurobiol* 10, 381-391.
 95. Ko, M. L., Hu, D. N., Ritch, R., Sharma, S. C., and Chen, C. F. (2001) Patterns of retinal ganglion cell survival after brain-derived neurotrophic factor administration in hypertensive eyes of rats, *Neurosci Lett* 305, 139-142.
 96. Quigley, H. A., McKinnon, S. J., Zack, D. J., Pease, M. E., Kerrigan-Baumrind, L. A., Kerrigan, D. F., and Mitchell, R. S. (2000) Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 3460-3466.
 97. Berkelaar, M., Clarke, D. B., Wang, Y. C., Bray, G. M., and Aguayo, A. J. (1994) Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats, *J Neurosci* 14, 4368-4374.
 98. Peinado-Ramon, P., Salvador, M., Villegas-Perez, M. P., and Vidal-Sanz, M. (1996) Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. A quantitative in vivo study, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37, 489-500.
-

99. Rodriguez-Tebar, A., Jeffrey, P. L., Thoenen, H., and Barde, Y. A. (1989) The survival of chick retinal ganglion cells in response to brain-derived neurotrophic factor depends on their embryonic age, *Dev Biol* 136, 296-303.
100. Johnson, J. E., Barde, Y. A., Schwab, M., and Thoenen, H. (1986) Brain-derived neurotrophic factor supports the survival of cultured rat retinal ganglion cells, *J Neurosci* 6, 3031-3038.
101. Yan, Q., Wang, J., Matheson, C. R., and Urich, J. L. (1999) Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) promotes the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats: comparison to and combination with brain-derived neurotrophic factor (BDNF), *J Neurobiol* 38, 382-390.
102. Zhang, C. W., Lu, Q., You, S. W., Zhi, Y., Yip, H. K., Wu, W., So, K. F., and Cui, Q. (2005) CNTF and BDNF have similar effects on retinal ganglion cell survival but differential effects on nitric oxide synthase expression soon after optic nerve injury, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 1497-1503.
103. Mansour-Robaey, S., Clarke, D. B., Wang, Y. C., Bray, G. M., and Aguayo, A. J. (1994) Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1632-1636.
104. Mey, J., and Thanos, S. (1993) Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats in vivo, *Brain Res* 602, 304-317.
105. Butowt, R., and von Bartheld, C. S. (2005) Anterograde axonal transport of BDNF and NT-3 by retinal ganglion cells: roles of neurotrophin receptors, *Mol Cell Neurosci* 29, 11-25.
106. Chytrova, G., and Johnson, J. E. (2004) Spontaneous retinal activity modulates BDNF trafficking in the developing chick visual system, *Mol Cell Neurosci* 25, 549-557.
107. Von Bartheld, C. S., and Johnson, J. E. (2001) Target-derived BDNF (brain-derived neurotrophic factor) is essential for the survival of developing neurons in the isthmo-optic nucleus, *J Comp Neurol* 433, 550-564.
108. Karlsson, M., and Hallbook, F. (1998) Kainic acid, tetrodotoxin and light modulate expression of brain-derived neurotrophic factor in developing avian retinal ganglion cells and their tectal target, *Neuroscience* 83, 137-150.
109. Herzog, K. H., and von Bartheld, C. S. (1998) Contributions of the optic tectum and the retina as sources of brain-derived neurotrophic factor for retinal ganglion cells in the chick embryo, *J Neurosci* 18, 2891-2906.
110. Cui, Q., Tang, L. S., Hu, B., So, K. F., and Yip, H. K. (2002) Expression of trkA, trkB, and trkC in injured and regenerating retinal ganglion cells of adult rats, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 1954-1964.
111. Gao, H., Qiao, X., Hefti, F., Hollyfield, J. G., and Knusel, B. (1997) Elevated mRNA expression of brain-derived neurotrophic factor in retinal ganglion cell layer after optic nerve injury, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 1840-1847.
112. Di Polo, A., Aigner, L. J., Dunn, R. J., Bray, G. M., and Aguayo, A. J. (1998) Prolonged delivery of brain-derived neurotrophic factor by adenovirus-infected Muller cells temporarily rescues injured retinal ganglion cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3978-3983.

113. Isenmann, S., Klocker, N., Gravel, C., and Bahr, M. (1998) Short communication: protection of axotomized retinal ganglion cells by adenovirally delivered BDNF in vivo, *Eur J Neurosci* 10, 2751-2756.
114. Meyer-Franke, A., Kaplan, M. R., Pfrieger, F. W., and Barres, B. A. (1995) Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture, *Neuron* 15, 805-819.
115. Deogracias, R., Espliguero, G., Iglesias, T., and Rodriguez-Pena, A. (2004) Expression of the neurotrophin receptor trkB is regulated by the cAMP/CREB pathway in neurons, *Mol Cell Neurosci* 26, 470-480.
116. Insel, P. A., and Ostrom, R. S. (2003) Forskolin as a tool for examining adenylyl cyclase expression, regulation, and G protein signaling, *Cell Mol Neurobiol* 23, 305-314.
117. Meyer-Franke, A., Wilkinson, G. A., Kruttgen, A., Hu, M., Munro, E., Hanson, M. G., Jr., Reichardt, L. F., and Barres, B. A. (1998) Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons, *Neuron* 21, 681-693.
118. Ellis, J. H., Richards, D. E., and Rogers, J. H. (1991) Calretinin and calbindin in the retina of the developing chick, *Cell Tissue Res* 264, 197-208.
119. Tombran-Tink, J., and Johnson, L. V. (1989) Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30, 1700-1707.
120. Tombran-Tink, J., Chader, G. G., and Johnson, L. V. (1991) PEDF: a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity, *Exp Eye Res* 53, 411-414.
121. Jablonski, M. M., and Iannaccone, A. (2000) Targeted disruption of Muller cell metabolism induces photoreceptor dysmorphogenesis, *Glia* 32, 192-204.
122. Stiemke, M. M., Landers, R. A., al-Ubaidi, M. R., Rayborn, M. E., and Hollyfield, J. G. (1994) Photoreceptor outer segment development in *Xenopus laevis*: influence of the pigment epithelium, *Dev Biol* 162, 169-180.
123. Hollyfield, J. G., and Witkovsky, P. (1974) Pigmented retinal epithelium involvement in photoreceptor development and function, *J Exp Zool* 189, 357-378.
124. Jablonski, M. M., Tombran-Tink, J., Mrazek, D. A., and Iannaccone, A. (2000) Pigment epithelium-derived factor supports normal development of photoreceptor neurons and opsin expression after retinal pigment epithelium removal, *J Neurosci* 20, 7149-7157.
125. Tombran-Tink, J., Aparicio, S., Xu, X., Tink, A. R., Lara, N., Sawant, S., Barnstable, C. J., and Zhang, S. S. (2005) PEDF and the serpins: phylogeny, sequence conservation, and functional domains, *J Struct Biol* 151, 130-150.
126. Wu, Y. Q., and Becerra, S. P. (1996) Proteolytic activity directed toward pigment epithelium-derived factor in vitreous of bovine eyes. Implications of proteolytic processing, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37, 1984-1993.
127. Wu, Y. Q., Notario, V., Chader, G. J., and Becerra, S. P. (1995) Identification of pigment epithelium-derived factor in the interphotoreceptor matrix of bovine eyes, *Protein Expr Purif* 6, 447-456.
128. Ortego, J., Escribano, J., Becerra, S. P., and Coca-Prados, M. (1996) Gene expression of the neurotrophic pigment epithelium-derived factor in the human

- ciliary epithelium. Synthesis and secretion into the aqueous humor, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37, 2759-2767.
129. Kozaki, K., Miyaishi, O., Koiwai, O., Yasui, Y., Kashiwai, A., Nishikawa, Y., Shimizu, S., and Saga, S. (1998) Isolation, purification, and characterization of a collagen-associated serpin, caspin, produced by murine colon adenocarcinoma cells, *J Biol Chem* 273, 15125-15130.
 130. Meyer, C., Notari, L., and Becerra, S. P. (2002) Mapping the type I collagen-binding site on pigment epithelium-derived factor. Implications for its antiangiogenic activity, *J Biol Chem* 277, 45400-45407.
 131. Tombran-Tink, J., and Barnstable, C. J. (2003) PEDF: a multifaceted neurotrophic factor, *Nat Rev Neurosci* 4, 628-636.
 132. Tombran-Tink, J., Mazuruk, K., Rodriguez, I. R., Chung, D., Linker, T., Englander, E., and Chader, G. J. (1996) Organization, evolutionary conservation, expression and unusual Alu density of the human gene for pigment epithelium-derived factor, a unique neurotrophic serpin, *Mol Vis* 2, 11.
 133. Behling, K. C., Surace, E. M., and Bennett, J. (2002) Pigment epithelium-derived factor expression in the developing mouse eye, *Mol Vis* 8, 449-454.
 134. Notari, L., Baladron, V., Aroca-Aguilar, J. D., Balko, N., Heredia, R., Meyer, C., Notario, P. M., Saravanamuthu, S., Nueda, M. L., Sanchez-Sanchez, F., Escribano, J., Laborda, J., and Becerra, S. P. (2006) Identification of a lipase-linked cell membrane receptor for pigment epithelium-derived factor, *J Biol Chem* 281, 38022-38037.
 135. Subramanian, P., Notario, P. M., and Becerra, S. P. (2010) Pigment epithelium-derived factor receptor (PEDF-R): a plasma membrane-linked phospholipase with PEDF binding affinity, *Adv Exp Med Biol* 664, 29-37.
 136. Yabe, T., Wilson, D., and Schwartz, J. P. (2001) NFkappaB activation is required for the neuroprotective effects of pigment epithelium-derived factor (PEDF) on cerebellar granule neurons, *J Biol Chem* 276, 43313-43319.
 137. Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K., and Tschoep, J. (2001) NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP, *Mol Cell Biol* 21, 5299-5305.
 138. Kataoka, T., Budd, R. C., Holler, N., Thome, M., Martinon, F., Irmeler, M., Burns, K., Hahne, M., Kennedy, N., Kovacsics, M., and Tschoep, J. (2000) The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways, *Curr Biol* 10, 640-648.
 139. Pang, I. H., Zeng, H., Fleenor, D. L., and Clark, A. F. (2007) Pigment epithelium-derived factor protects retinal ganglion cells, *BMC Neurosci* 8, 11.
 140. Taniwaki, T., Becerra, S. P., Chader, G. J., and Schwartz, J. P. (1995) Pigment epithelium-derived factor is a survival factor for cerebellar granule cells in culture, *J Neurochem* 64, 2509-2517.
 141. Taniwaki, T., Hirashima, N., Becerra, S. P., Chader, G. J., Etcheberrigaray, R., and Schwartz, J. P. (1997) Pigment epithelium-derived factor protects cultured cerebellar granule cells against glutamate-induced neurotoxicity, *J Neurochem* 68, 26-32.
 142. Araki, T., Taniwaki, T., Becerra, S. P., Chader, G. J., and Schwartz, J. P. (1998) Pigment epithelium-derived factor (PEDF) differentially protects immature but not mature cerebellar granule cells against apoptotic cell death, *J Neurosci Res* 53, 7-15.

-
143. DeCoster, M. A., Schabelman, E., Tombran-Tink, J., and Bazan, N. G. (1999) Neuroprotection by pigment epithelial-derived factor against glutamate toxicity in developing primary hippocampal neurons, *J Neurosci Res* 56, 604-610.
 144. Bilak, M. M., Corse, A. M., Bilak, S. R., Lehar, M., Tombran-Tink, J., and Kuncel, R. W. (1999) Pigment epithelium-derived factor (PEDF) protects motor neurons from chronic glutamate-mediated neurodegeneration, *J Neuropathol Exp Neurol* 58, 719-728.
 145. Becerra, S. P., Palmer, I., Kumar, A., Steele, F., Shiloach, J., Notario, V., and Chader, G. J. (1993) Overexpression of fetal human pigment epithelium-derived factor in *Escherichia coli*. A functionally active neurotrophic factor, *J Biol Chem* 268, 23148-23156.
 146. Zheng, Z., Chen, H., Zhao, H., Liu, K., Luo, D., Chen, Y., Yang, X., Gu, Q., and Xu, X. (2010) Inhibition of JAK2/STAT3-mediated VEGF upregulation under high glucose conditions by PEDF through a mitochondrial ROS pathway in vitro, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 64-71.
 147. Cao, W., Tombran-Tink, J., Chen, W., Mrazek, D., Elias, R., and McGinnis, J. F. (1999) Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal neurons against hydrogen peroxide-induced cell death, *J Neurosci Res* 57, 789-800.
 148. Cayouette, M., Smith, S. B., Becerra, S. P., and Gravel, C. (1999) Pigment epithelium-derived factor delays the death of photoreceptors in mouse models of inherited retinal degenerations, *Neurobiol Dis* 6, 523-532.
 149. Imai, D., Yoneya, S., Gehlbach, P. L., Wei, L. L., and Mori, K. (2005) Intraocular gene transfer of pigment epithelium-derived factor rescues photoreceptors from light-induced cell death, *J Cell Physiol* 202, 570-578.
 150. Goliath, R., Tombran-Tink, J., Rodriguez, I. R., Chader, G., Ramesar, R., and Greenberg, J. (1996) The gene for PEDF, a retinal growth factor is a prime candidate for retinitis pigmentosa and is tightly linked to the RP13 locus on chromosome 17p13.3, *Mol Vis* 2, 5.
 151. Eberhardt, K. (2007) Die Retinogenese im dreidimensionalen Zellkultursystem des Huhns: Eine zell- und molekularbiologische Studie neurotropher Funktionen der Zytokine GDNF, BDNF und PEDF, *Dissertation an der TU Darmstadt*.
 152. Crawford, S. E., Stellmach, V., Ranalli, M., Huang, X., Huang, L., Volpert, O., De Vries, G. H., Abramson, L. P., and Bouck, N. (2001) Pigment epithelium-derived factor (PEDF) in neuroblastoma: a multifunctional mediator of Schwann cell antitumor activity, *J Cell Sci* 114, 4421-4428.
 153. Gao, G., Li, Y., Zhang, D., Gee, S., Crosson, C., and Ma, J. (2001) Unbalanced expression of VEGF and PEDF in ischemia-induced retinal neovascularization, *FEBS Lett* 489, 270-276.
 154. Gao, G., Li, Y., Gee, S., Dudley, A., Fant, J., Crosson, C., and Ma, J. X. (2002) Down-regulation of vascular endothelial growth factor and up-regulation of pigment epithelium-derived factor: a possible mechanism for the anti-angiogenic activity of plasminogen kringle 5, *J Biol Chem* 277, 9492-9497.
 155. Doll, J. A., Stellmach, V. M., Bouck, N. P., Bergh, A. R., Lee, C., Abramson, L. P., Cornwell, M. L., Pins, M. R., Borensztajn, J., and Crawford, S. E. (2003) Pigment epithelium-derived factor regulates the vasculature and mass of the prostate and pancreas, *Nat Med* 9, 774-780.
-

-
156. Cai, J., Parr, C., Watkins, G., Jiang, W. G., and Boulton, M. (2006) Decreased pigment epithelium-derived factor expression in human breast cancer progression, *Clin Cancer Res* 12, 3510-3517.
 157. Li, S., Chen, Y., and Wei, H. (2001) [Muscle pigment epithelium-derived factor gene associating with tumorigenesis of B16 melanoma], *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 30, 281-284.
 158. Abe, R., Shimizu, T., Yamagishi, S., Shibaki, A., Amano, S., Inagaki, Y., Watanabe, H., Sugawara, H., Nakamura, H., Takeuchi, M., Imaizumi, T., and Shimizu, H. (2004) Overexpression of pigment epithelium-derived factor decreases angiogenesis and inhibits the growth of human malignant melanoma cells in vivo, *Am J Pathol* 164, 1225-1232.
 159. Kuncel, R. W., Bilak, M. M., Bilak, S. R., Corse, A. M., Royal, W., and Becerra, S. P. (2002) Pigment epithelium-derived factor is elevated in CSF of patients with amyotrophic lateral sclerosis, *J Neurochem* 81, 178-184.
 160. Ogata, N., Tombran-Tink, J., Jo, N., Mrazek, D., and Matsumura, M. (2001) Upregulation of pigment epithelium-derived factor after laser photocoagulation, *Am J Ophthalmol* 132, 427-429.
 161. Spranger, J., Osterhoff, M., Reimann, M., Mohlig, M., Ristow, M., Francis, M. K., Cristofalo, V., Hammes, H. P., Smith, G., Boulton, M., and Pfeiffer, A. F. (2001) Loss of the antiangiogenic pigment epithelium-derived factor in patients with angiogenic eye disease, *Diabetes* 50, 2641-2645.
 162. Apte, R. S., Barreiro, R. A., Duh, E., Volpert, O., and Ferguson, T. A. (2004) Stimulation of neovascularization by the anti-angiogenic factor PEDF, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 4491-4497.
 163. Pochon, N. A., Menoud, A., Tseng, J. L., Zurn, A. D., and Aebischer, P. (1997) Neuronal GDNF expression in the adult rat nervous system identified by in situ hybridization, *Eur J Neurosci* 9, 463-471.
 164. Kotzbauer, P. T., Lampe, P. A., Heuckeroth, R. O., Golden, J. P., Creedon, D. J., Johnson, E. M., Jr., and Milbrandt, J. (1996) Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor, *Nature* 384, 467-470.
 165. Baloh, R. H., Tansey, M. G., Lampe, P. A., Fahrner, T. J., Enomoto, H., Simburger, K. S., Leitner, M. L., Araki, T., Johnson, E. M., Jr., and Milbrandt, J. (1998) Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex, *Neuron* 21, 1291-1302.
 166. Masure, S., Geerts, H., Cik, M., Hoefnagel, E., Van Den Kieboom, G., Tuytelaars, A., Harris, S., Lesage, A. S., Leysen, J. E., Van Der Helm, L., Verhasselt, P., Yon, J., and Gordon, R. D. (1999) Enovin, a member of the glial cell-line-derived neurotrophic factor (GDNF) family with growth promoting activity on neuronal cells. Existence and tissue-specific expression of different splice variants, *Eur J Biochem* 266, 892-902.
 167. Milbrandt, J., de Sauvage, F. J., Fahrner, T. J., Baloh, R. H., Leitner, M. L., Tansey, M. G., Lampe, P. A., Heuckeroth, R. O., Kotzbauer, P. T., Simburger, K. S., Golden, J. P., Davies, J. A., Vejsada, R., Kato, A. C., Hynes, M., Sherman, D., Nishimura, M., Wang, L. C., Vandlen, R., Moffat, B., Klein, R. D., Poulsen, K., Gray, C., Garces, A., Johnson, E. M., Jr., and et al. (1998) Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin, *Neuron* 20, 245-253.
-

-
168. Airaksinen, M. S., and Saarma, M. (2002) The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value, *Nat Rev Neurosci* 3, 383-394.
 169. Treanor, J. J., Goodman, L., de Sauvage, F., Stone, D. M., Poulsen, K. T., Beck, C. D., Gray, C., Armanini, M. P., Pollock, R. A., Hefti, F., Phillips, H. S., Goddard, A., Moore, M. W., Buj-Bello, A., Davies, A. M., Asai, N., Takahashi, M., Vandlen, R., Henderson, C. E., and Rosenthal, A. (1996) Characterization of a multicomponent receptor for GDNF, *Nature* 382, 80-83.
 170. Baloh, R. H., Enomoto, H., Johnson, E. M., Jr., and Milbrandt, J. (2000) The GDNF family ligands and receptors - implications for neural development, *Curr Opin Neurobiol* 10, 103-110.
 171. Airaksinen, M. S., Titievsky, A., and Saarma, M. (1999) GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant?, *Mol Cell Neurosci* 13, 313-325.
 172. Trupp, M., Raynoschek, C., Belluardo, N., and Ibanez, C. F. (1998) Multiple GPI-anchored receptors control GDNF-dependent and independent activation of the c-Ret receptor tyrosine kinase, *Mol Cell Neurosci* 11, 47-63.
 173. Hauck, S. M., Kinkl, N., Deeg, C. A., Swiatek-de Lange, M., Schoffmann, S., and Ueffing, M. (2006) GDNF family ligands trigger indirect neuroprotective signaling in retinal glial cells, *Mol Cell Biol* 26, 2746-2757.
 174. Wolf, C., Rothermel, A., and Robitzki, A. A. (2008) Neurturin, a member of the glial cell line-derived neurotrophic factor family, affects the development of acetylcholinesterase-positive cells in a three-dimensional model system of retinogenesis, *J Neurochem* 107, 96-104.
 175. Lin, L. F., Doherty, D. H., Lile, J. D., Bektesh, S., and Collins, F. (1993) GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons, *Science* 260, 1130-1132.
 176. Tomac, A., Lindqvist, E., Lin, L. F., Ogren, S. O., Young, D., Hoffer, B. J., and Olson, L. (1995) Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo, *Nature* 373, 335-339.
 177. Saarma, M. (2000) GDNF - a stranger in the TGF-beta superfamily?, *Eur J Biochem* 267, 6968-6971.
 178. Henderson, C. E., Phillips, H. S., Pollock, R. A., Davies, A. M., Lemeulle, C., Armanini, M., Simmons, L., Moffet, B., Vandlen, R. A., Simpson, L. C., and et al. (1994) GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle, *Science* 266, 1062-1064.
 179. Buj-Bello, A., Buchman, V. L., Horton, A., Rosenthal, A., and Davies, A. M. (1995) GDNF is an age-specific survival factor for sensory and autonomic neurons, *Neuron* 15, 821-828.
 180. Volpert, K. N., Rothermel, A., and Layer, P. G. (2007) GDNF stimulates rod photoreceptors and dopaminergic amacrine cells in chicken retinal reagggregates, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 5306-5314.
 181. Frasson, M., Picaud, S., Leveillard, T., Simonutti, M., Mohand-Said, S., Dreyfus, H., Hicks, D., and Sabel, J. (1999) Glial cell line-derived neurotrophic factor induces histologic and functional protection of rod photoreceptors in the rd/rd mouse, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 2724-2734.
 182. Nosrat, C. A., Tomac, A., Lindqvist, E., Lindskog, S., Humpel, C., Stromberg, I., Ebendal, T., Hoffer, B. J., and Olson, L. (1996) Cellular expression of GDNF
-

- mRNA suggests multiple functions inside and outside the nervous system, *Cell Tissue Res* 286, 191-207.
183. Golden, J. P., DeMaro, J. A., Osborne, P. A., Milbrandt, J., and Johnson, E. M., Jr. (1999) Expression of neurturin, GDNF, and GDNF family-receptor mRNA in the developing and mature mouse, *Exp Neurol* 158, 504-528.
 184. Randall, W. R., Tsim, K. W., Lai, J., and Barnard, E. A. (1987) Monoclonal antibodies against chicken brain acetylcholinesterase. Their use in immunopurification and immunochemistry to demonstrate allelic variants of the enzyme, *Eur J Biochem* 164, 95-102.
 185. Tsim, K. W., Randall, W. R., and Barnard, E. A. (1988) Monoclonal antibodies specific for the different subunits of asymmetric acetylcholinesterase from chick muscle, *J Neurochem* 51, 95-104.
 186. Halfter, W., Yip, Y. P., and Yip, J. W. (1994) Axonin 1 is expressed primarily in subclasses of avian sensory neurons during outgrowth, *Brain Res Dev Brain Res* 78, 87-101.
 187. Johnson, C. D., and Epstein, M. L. (1986) Monoclonal antibodies and polyvalent antiserum to chicken choline acetyltransferase, *J Neurochem* 46, 968-976.
 188. Millar, T., Ishimoto, I., Johnson, C. D., Epstein, M. L., Chubb, I. W., and Morgan, I. G. (1985) Cholinergic and acetylcholinesterase-containing neurons of the chicken retina, *Neurosci Lett* 61, 311-316.
 189. Reiss, Y., Kroger, S., Grassi, J., Tsim, K. W., Willbold, E., and Layer, P. G. (1996) Extracellular and asymmetric forms of acetylcholinesterase are expressed on cholinergic and noncholinergic terminal neuropil of the developing chick retina, *Cell Tissue Res* 286, 13-22.
 190. Prada, F., Medina, J. I., Lopez-Gallardo, M., Lopez, R., Quesada, A., Spira, A., and Prada, C. (1999) Spatiotemporal gradients of differentiation of chick retina types I and II cholinergic cells: identification of a common postmitotic cell population, *J Comp Neurol* 410, 457-466.
 191. Schwaller, B., Buchwald, P., Blumcke, I., Celio, M. R., and Hunziker, W. (1993) Characterization of a polyclonal antiserum against the purified human recombinant calcium binding protein calretinin, *Cell Calcium* 14, 639-648.
 192. Schiffmann, S. N., Cheron, G., Lohof, A., d'Alcantara, P., Meyer, M., Parmentier, M., and Schurmans, S. (1999) Impaired motor coordination and Purkinje cell excitability in mice lacking calretinin, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5257-5262.
 193. Doglioni, C., Dei Tos, A. P., Laurino, L., Iuzzolino, P., Chiarelli, C., Celio, M. R., and Viale, G. (1996) Calretinin: a novel immunocytochemical marker for mesothelioma, *Am J Surg Pathol* 20, 1037-1046.
 194. Schalken, J. J., Janssen, J. J., Sanyal, S., Hawkins, R. K., and de Grip, W. J. (1990) Development and degeneration of retina in rds mutant mice: immunoassay of the rod visual pigment rhodopsin, *Biochim Biophys Acta* 1033, 103-109.
 195. Foster, R. G., Provencio, I., Hudson, D., Fiske, S., De Grip, W., and Menaker, M. (1991) Circadian photoreception in the retinally degenerate mouse (rd/rd), *J Comp Physiol A* 169, 39-50.
 196. Garcia-Fernandez, J. M., Jimenez, A. J., Gonzalez, B., Pombal, M. A., and Foster, R. G. (1997) An immunocytochemical study of encephalic photoreceptors in three species of lamprey, *Cell Tissue Res* 288, 267-278.

-
197. Linser, P., and Moscona, A. A. (1979) Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina: localization in Muller fibers and dependence on cell interactions, *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 6476-6480.
 198. Rathjen, F. G., Wolff, J. M., Frank, R., Bonhoeffer, F., and Rutishauser, U. (1987) Membrane glycoproteins involved in neurite fasciculation, *J Cell Biol* 104, 343-353.
 199. Henion, P. D., Blyss, G. K., Luo, R., An, M., Maynard, T. M., Cole, G. J., and Weston, J. A. (2000) Avian transitin expression mirrors glial cell fate restrictions during neural crest development, *Dev Dyn* 218, 150-159.
 200. Fischer, A. J., and Omar, G. (2005) Transitin, a nestin-related intermediate filament, is expressed by neural progenitors and can be induced in Muller glia in the chicken retina, *J Comp Neurol* 484, 1-14.
 201. Hitchcock, P. F., Macdonald, R. E., VanDeRyt, J. T., and Wilson, S. W. (1996) Antibodies against Pax6 immunostain amacrine and ganglion cells and neuronal progenitors, but not rod precursors, in the normal and regenerating retina of the goldfish, *J Neurobiol* 29, 399-413.
 202. Herman, J. P., Victor, J. C., and Sanes, J. R. (1993) Developmentally regulated and spatially restricted antigens of radial glial cells, *Dev Dyn* 197, 307-318.
 203. Yamagata, K., Goto, K., Kuo, C. H., Kondo, H., and Miki, N. (1990) Visinin: a novel calcium binding protein expressed in retinal cone cells, *Neuron* 4, 469-476.
 204. Hamburger, V., and Hamilton, H. L. (1992) A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951, *Dev Dyn* 195, 231-272.
 205. Rothermel, A. (2000) Der Einfluß von Müller- und Pigmentepithelzellen auf die Schichtenbildung und die Photozeptordifferenzierung in der Retina des Huhns., *Dissertation an der TU Darmstadt*.
 206. Karnovsky, M. J., and Roots, L. (1964) A "DIRECT-COLORING" THIOCHOLINE METHOD FOR CHOLINESTERASES, *J Histochem Cytochem* 12, 219-221.
 207. Hanker, J. S., Thornburg, L. P., Yates, P. E., and Moore, H. G., 3rd. (1973) The demonstration of cholinesterases by the formation of osmium blacks at the sites of Hatchett's brown, *Histochemie* 37, 223-242.
 208. Tsuji, S. (1974) On the chemical basis of thiocholine methods for demonstration of acetylcholinesterase activities, *Histochemistry* 42, 99-110.
 209. Aebi, H. (1984) Catalase in vitro, *Methods Enzymol* 105, 121-126.
 210. Cohen, G., Kim, M., and Ogwu, V. (1996) A modified catalase assay suitable for a plate reader and for the analysis of brain cell cultures, *J Neurosci Methods* 67, 53-56.
 211. Lemmon, V., and Rieser, G. (1983) The development distribution of vimentin in the chick retina, *Brain Res* 313, 191-197.
 212. Dhariwal, K. R., Hartzell, W. O., and Levine, M. (1991) Ascorbic acid and dehydroascorbic acid measurements in human plasma and serum, *Am J Clin Nutr* 54, 712-716.
 213. Hosoya, K., Minamizono, A., Katayama, K., Terasaki, T., and Tomi, M. (2004) Vitamin C transport in oxidized form across the rat blood-retinal barrier, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 1232-1239.
 214. Takata, K., Kasahara, T., Kasahara, M., Ezaki, O., and Hirano, H. (1992) Ultracytochemical localization of the erythrocyte/HepG2-type glucose transporter
-

- (GLUT1) in cells of the blood-retinal barrier in the rat, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33, 377-383.
215. Wang, Y., Mackenzie, B., Tsukaguchi, H., Weremowicz, S., Morton, C. C., and Hediger, M. A. (2000) Human vitamin C (L-ascorbic acid) transporter SVCT1, *Biochem Biophys Res Commun* 267, 488-494.
216. Rothermel, A., and Layer, P. G. (2003) GDNF regulates chicken rod photoreceptor development and survival in reaggregated histotypic retinal spheres, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 2221-2228.
217. Karlsson, M., Lindqvist, N., Mayordomo, R., and Hallbook, F. (2002) Overlapping and specific patterns of GDNF, c-ret and GFR alpha mRNA expression in the developing chicken retina, *Mech Dev* 114, 161-165.
218. Reis, R. A., Cabral da Silva, M. C., Loureiro dos Santos, N. E., Bampton, E., Taylor, J. S., de Mello, F. G., and Linden, R. (2002) Sympathetic neuronal survival induced by retinal trophic factors, *J Neurobiol* 50, 13-23.
219. Duarte, T. L., and Lunec, J. (2005) Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C, *Free Radic Res* 39, 671-686.
220. Harman, D. (2006) Alzheimer's disease pathogenesis: role of aging, *Ann N Y Acad Sci* 1067, 454-460.
221. Chang, H. J., Park, J. S., Lee, E. K., Kim, M. H., Baek, M. K., Kim, H. R., Jeong, H. G., Choi, S. Y., and Jung, Y. D. (2009) Ascorbic acid suppresses the 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced CYP1A1 expression in human HepG2 cells, *Toxicol In Vitro* 23, 622-626.
222. May, J. M. (1998) Ascorbate function and metabolism in the human erythrocyte, *Front Biosci* 3, d1-10.
223. Kaufman, S. (1966) Coenzymes and hydroxylases: ascorbate and dopamine-beta-hydroxylase; tetrahydropteridines and phenylalanine and tyrosine hydroxylases, *Pharmacol Rev* 18, 61-69.
224. Nielsen, C. M., Hansen, K., Andersen, H. M., Gerstoft, J., and Vestergaard, B. F. (1987) A biotin-avidin-amplified inhibition enzyme immunoassay for detection of CMV antibodies in human serum, *J Virol Methods* 16, 195-208.
225. Booij, J. (1940) The vitamin-C content of blood and cerebrospinal, *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* 59, 713-719.
226. Neal, M. J., Cunningham, J. R., and Matthews, K. L. (1999) Release of endogenous ascorbic acid preserves extracellular dopamine in the mammalian retina, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 2983-2987.
227. McBean, G. J. (1990) Intrastriatal injection of DL-alpha-aminoadipate reduces kainate toxicity in vitro, *Neuroscience* 34, 225-234.
228. Winkler, B. S., Arnold, M. J., Brassell, M. A., and Puro, D. G. (2000) Energy metabolism in human retinal Muller cells, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 3183-3190.
229. Zhu, X., Sun, Y., Wang, Z., Cui, W., Peng, Y., and Li, R. (2012) Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor and its receptors in cultured retinal Muller cells under high glucose circumstance, *Anat Rec (Hoboken)* 295, 532-539.
230. Chievitz, J. H. (1887) Die Area und Fovea centralis retinae beim menschlichen Foetus., *Internationalen Monatsschrift für Anatomie und Physiologie* 4, 201-226.

-
231. Rose, R. C., and Bode, A. M. (1991) Ocular ascorbate transport and metabolism, *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 100, 273-285.
232. Ha, Y. M., Park, M. K., Kim, H. J., Seo, H. G., Lee, J. H., and Chang, K. C. (2009) High concentrations of ascorbic acid induces apoptosis of human gastric cancer cell by p38-MAP kinase-dependent up-regulation of transferrin receptor, *Cancer Lett* 277, 48-54.
233. Karl, A., Wurm, A., Pannicke, T., Krugel, K., Obara-Michlewska, M., Wiedemann, P., Reichenbach, A., Albrecht, J., and Bringmann, A. (2011) Synergistic action of hypoosmolarity and glutamine in inducing acute swelling of retinal glial (Muller) cells, *Glia* 59, 256-266.
234. Reichenbach, A., Wurm, A., Pannicke, T., Iandiev, I., Wiedemann, P., and Bringmann, A. (2007) Muller cells as players in retinal degeneration and edema, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 245, 627-636.
235. Krugel, K., Wurm, A., Pannicke, T., Hollborn, M., Karl, A., Wiedemann, P., Reichenbach, A., Kohen, L., and Bringmann, A. (2011) Involvement of oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the osmotic swelling of retinal glial cells from diabetic rats, *Exp Eye Res* 92, 87-93.
236. Lapchak, P. A., Gash, D. M., Collins, F., Hilt, D., Miller, P. J., and Araujo, D. M. (1997) Pharmacological activities of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF): preclinical development and application to the treatment of Parkinson's disease, *Exp Neurol* 145, 309-321.
237. Baranyay, F., Bogar, G., and Sebestyen, M. (2000) [Adult Hirschsprung's disease with mental retardation and microcephaly], *Orv Hetil* 141, 1673-1676.
238. Bordeaux, M. C., Forcet, C., Granger, L., Corset, V., Bidaud, C., Billaud, M., Bredesen, D. E., Edery, P., and Mehlen, P. (2000) The RET proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease, *EMBO J* 19, 4056-4063.
239. McGee Sanftner, L. H., Abel, H., Hauswirth, W. W., and Flannery, J. G. (2001) Glial cell line derived neurotrophic factor delays photoreceptor degeneration in a transgenic rat model of retinitis pigmentosa, *Mol Ther* 4, 622-629.
240. Harada, C., Harada, T., Quah, H. M., Maekawa, F., Yoshida, K., Ohno, S., Wada, K., Parada, L. F., and Tanaka, K. (2003) Potential role of glial cell line-derived neurotrophic factor receptors in Muller glial cells during light-induced retinal degeneration, *Neuroscience* 122, 229-235.
241. Del Rio, P., Irmeler, M., Arango-Gonzalez, B., Favor, J., Bobe, C., Bartsch, U., Vecino, E., Beckers, J., Hauck, S. M., and Ueffing, M. (2011) GDNF-induced osteopontin from Muller glial cells promotes photoreceptor survival in the Pde6brd1 mouse model of retinal degeneration, *Glia* 59, 821-832.
242. Brantley, M. A., Jr., Jain, S., Barr, E. E., Johnson, E. M., Jr., and Milbrandt, J. (2008) Neurturin-mediated ret activation is required for retinal function, *J Neurosci* 28, 4123-4135.
243. Bruhn, S. L., and Cepko, C. L. (1996) Development of the pattern of photoreceptors in the chick retina, *J Neurosci* 16, 1430-1439.
244. Phillips, M. J., and Otteson, D. C. (2011) Differential expression of neuronal genes in Muller glia in two- and three-dimensional cultures, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 1439-1449.
-

- 245. Giblin, F. J., McCready, J. P., Kodama, T., and Reddy, V. N. (1984) A direct correlation between the levels of ascorbic acid and H₂O₂ in aqueous humor, *Exp Eye Res* 38, 87-93.
- 246. Levine, M., Conry-Cantilena, C., Wang, Y., Welch, R. W., Washko, P. W., Dhariwal, K. R., Park, J. B., Lazarev, A., Graumlich, J. F., King, J., and Cantilena, L. R. (1996) Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3704-3709.
- 247. Grunewald, R. A. (1993) Ascorbic acid in the brain, *Brain Res Brain Res Rev* 18, 123-133.
- 248. Hornig, D. (1975) Distribution of ascorbic acid, metabolites and analogues in man and animals, *Ann N Y Acad Sci* 258, 103-118.
- 249. Kratzing, C. C., Kelly, J. D., and Oelrichs, B. A. (1982) Ascorbic acid in neural tissues, *J Neurochem* 39, 625-627.
- 250. Minamizono, A., Tomi, M., and Hosoya, K. (2006) Inhibition of dehydroascorbic acid transport across the rat blood-retinal and -brain barriers in experimental diabetes, *Biol Pharm Bull* 29, 2148-2150.
- 251. Tsukaguchi, H., Tokui, T., Mackenzie, B., Berger, U. V., Chen, X. Z., Wang, Y., Brubaker, R. F., and Hediger, M. A. (1999) A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters, *Nature* 399, 70-75.
- 252. Castro, M. A., Beltran, F. A., Brauchi, S., and Concha, II. (2009) A metabolic switch in brain: glucose and lactate metabolism modulation by ascorbic acid, *J Neurochem* 110, 423-440.
- 253. Reichenbach, A. (1999) Neuroglia - das andere zelluläre Element im Nervensystem: Die Müllersche Gliazelle, *Socio-Medico*, 227 Seiten.
- 254. Bachmann, G. (2012) Die Bedeutung der inneren plexiformen Schicht in der Retinogenese: Glutamatbehandlung von Rosettensphäroiden., *Dissertation an der TU Darmstadt*.
- 255. Chen, Q., Espey, M. G., Krishna, M. C., Mitchell, J. B., Corpe, C. P., Buettner, G. R., Shacter, E., and Levine, M. (2005) Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13604-13609.
- 256. Cameron, E., and Pauling, L. (1976) Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Prolongation of survival times in terminal human cancer, *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 3685-3689.
- 257. Cameron, E., Pauling, L., and Leibovitz, B. (1979) Ascorbic acid and cancer: a review, *Cancer Res* 39, 663-681.
- 258. Prasad, K. N., Sinha, P. K., Ramanujam, M., and Sakamoto, A. (1979) Sodium ascorbate potentiates the growth inhibitory effect of certain agents on neuroblastoma cells in culture, *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 829-832.
- 259. Park, C. H., Amare, M., Savin, M. A., and Hoogstraten, B. (1980) Growth suppression of human leukemic cells in vitro by L-ascorbic acid, *Cancer Res* 40, 1062-1065.
- 260. Wahlin, K. J., Lim, L., Grice, E. A., Campochiaro, P. A., Zack, D. J., and Adler, R. (2004) A method for analysis of gene expression in isolated mouse photoreceptor and Muller cells, *Mol Vis* 10, 366-375.

-
261. Taylor, S., Srinivasan, B., Wordinger, R. J., and Roque, R. S. (2003) Glutamate stimulates neurotrophin expression in cultured Muller cells, *Brain Res Mol Brain Res* 111, 189-197.
262. Aymerich, M. S., Alberdi, E. M., Martinez, A., and Becerra, S. P. (2001) Evidence for pigment epithelium-derived factor receptors in the neural retina, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 3287-3293.
263. Kato, S., Sugawara, K., Matsukawa, T., and Negishi, K. (1990) Gliotoxic effects of alpha-aminoadipic acid isomers on the carp retina: a long term observation, *Neuroscience* 36, 145-153.
264. Chen, S. T., Wang, J. P., Garey, L. J., and Jen, L. S. (1999) Expression of beta-amyloid precursor and Bcl-2 proto-oncogene proteins in rat retinas after intravitreal injection of aminoadipic acid, *Neurochem Int* 35, 371-382.
265. Andrieu-Soler, C., Aubert-Pouessel, A., Doat, M., Picaud, S., Halhal, M., Simonutti, M., Venier-Julienne, M. C., Benoit, J. P., and Behar-Cohen, F. (2005) Intravitreal injection of PLGA microspheres encapsulating GDNF promotes the survival of photoreceptors in the rd1/rd1 mouse, *Mol Vis* 11, 1002-1011.
266. Kyhn, M. V., Klassen, H., Johansson, U. E., Warfvinge, K., Lavik, E., Kiilgaard, J. F., Prause, J. U., Scherfig, E., Young, M., and la Cour, M. (2009) Delayed administration of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) protects retinal ganglion cells in a pig model of acute retinal ischemia, *Exp Eye Res* 89, 1012-1020.
267. Cao, W., Tombran-Tink, J., Elias, R., Sezate, S., Mrazek, D., and McGinnis, J. F. (2001) In vivo protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 1646-1652.
268. Takeda, M., Takamiya, A., Jiao, J. W., Cho, K. S., Trevino, S. G., Matsuda, T., and Chen, D. F. (2008) alpha-Aminoadipate induces progenitor cell properties of Muller glia in adult mice, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49, 1142-1150.
269. Koyama, Y., Kimura, Y., and Baba, A. (1997) Induction of glutamine synthetase by L-alpha-aminoadipate in developmental stages of cultured astrocytes, *Neurosci Lett* 223, 65-68.
270. Bringmann, A., and Reichenbach, A. (2001) Role of Muller cells in retinal degenerations, *Front Biosci* 6, E72-92.
271. Francke, M., Pannicke, T., Biedermann, B., Faude, F., Wiedemann, P., Reichenbach, A., and Reichelt, W. (1997) Loss of inwardly rectifying potassium currents by human retinal glial cells in diseases of the eye, *Glia* 20, 210-218.
272. Lewis, G., Mervin, K., Valter, K., Maslim, J., Kappel, P. J., Stone, J., and Fisher, S. (1999) Limiting the proliferation and reactivity of retinal Muller cells during experimental retinal detachment: the value of oxygen supplementation, *Am J Ophthalmol* 128, 165-172.
273. Francke, M., Weick, M., Pannicke, T., Uckermann, O., Grosche, J., Goczalik, I., Milenkovic, I., Uhlmann, S., Faude, F., Wiedemann, P., Reichenbach, A., and Bringmann, A. (2002) Upregulation of extracellular ATP-induced Muller cell responses in a dispace model of proliferative vitreoretinopathy, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 870-881.
274. Amin, R. H., Frank, R. N., Kennedy, A., Elliott, D., Puklin, J. E., and Abrams, G. W. (1997) Vascular endothelial growth factor is present in glial cells of the retina and optic nerve of human subjects with nonproliferative diabetic retinopathy, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 36-47.
-

- 275. Hirata, C., Nakano, K., Nakamura, N., Kitagawa, Y., Shigeta, H., Hasegawa, G., Ogata, M., Ikeda, T., Sawa, H., Nakamura, K., Ienaga, K., Obayashi, H., and Kondo, M. (1997) Advanced glycation end products induce expression of vascular endothelial growth factor by retinal Muller cells, *Biochem Biophys Res Commun* 236, 712-715.
- 276. Hammes, H. P., Federoff, H. J., and Brownlee, M. (1995) Nerve growth factor prevents both neuroretinal programmed cell death and capillary pathology in experimental diabetes, *Mol Med* 1, 527-534.
- 277. Pannicke, T., Iandiev, I., Wurm, A., Uckermann, O., vom Hagen, F., Reichenbach, A., Wiedemann, P., Hammes, H. P., and Bringmann, A. (2006) Diabetes alters osmotic swelling characteristics and membrane conductance of glial cells in rat retina, *Diabetes* 55, 633-639.
- 278. Akiyama, H., Nakazawa, T., Shimura, M., Tomita, H., and Tamai, M. (2002) Presence of mitogen-activated protein kinase in retinal Muller cells and its neuroprotective effect ischemia-reperfusion injury, *Neuroreport* 13, 2103-2107.
- 279. Eichler, W., Yafai, Y., Keller, T., Wiedemann, P., and Reichenbach, A. (2004) PEDF derived from glial Muller cells: a possible regulator of retinal angiogenesis, *Exp Cell Res* 299, 68-78.
- 280. Pannicke, T., Iandiev, I., Uckermann, O., Biedermann, B., Kutzera, F., Wiedemann, P., Wolburg, H., Reichenbach, A., and Bringmann, A. (2004) A potassium channel-linked mechanism of glial cell swelling in the postischemic retina, *Mol Cell Neurosci* 26, 493-502.
- 281. Pannicke, T., Uckermann, O., Iandiev, I., Wiedemann, P., Reichenbach, A., and Bringmann, A. (2005) Ocular inflammation alters swelling and membrane characteristics of rat Muller glial cells, *J Neuroimmunol* 161, 145-154.
- 282. Tezel, G., Chauhan, B. C., LeBlanc, R. P., and Wax, M. B. (2003) Immunohistochemical assessment of the glial mitogen-activated protein kinase activation in glaucoma, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 3025-3033.
- 283. Bringmann, A., Francke, M., Pannicke, T., Biedermann, B., Faude, F., Enzmann, V., Wiedemann, P., Reichelt, W., and Reichenbach, A. (1999) Human Muller glial cells: altered potassium channel activity in proliferative vitreoretinopathy, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 3316-3323.
- 284. Nagelhus, E. A., Horio, Y., Inanobe, A., Fujita, A., Haug, F. M., Nielsen, S., Kurachi, Y., and Ottersen, O. P. (1999) Immunogold evidence suggests that coupling of K⁺ siphoning and water transport in rat retinal Muller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains, *Glia* 26, 47-54.
- 285. Kofuji, P., Biedermann, B., Siddharthan, V., Raap, M., Iandiev, I., Milenkovic, I., Thomzig, A., Veh, R. W., Bringmann, A., and Reichenbach, A. (2002) Kir potassium channel subunit expression in retinal glial cells: implications for spatial potassium buffering, *Glia* 39, 292-303.
- 286. Iandiev, I., Tenckhoff, S., Pannicke, T., Biedermann, B., Hollborn, M., Wiedemann, P., Reichenbach, A., and Bringmann, A. (2006) Differential regulation of Kir4.1 and Kir2.1 expression in the ischemic rat retina, *Neurosci Lett* 396, 97-101.
- 287. Wurm, A., Pannicke, T., Iandiev, I., Buhner, E., Pietsch, U. C., Reichenbach, A., Wiedemann, P., Uhlmann, S., and Bringmann, A. (2006) Changes in membrane conductance play a pathogenic role in osmotic glial cell swelling in detached retinas, *Am J Pathol* 169, 1990-1998.

-
288. Ganesh, B. S., and Chintala, S. K. (2011) Inhibition of reactive gliosis attenuates excitotoxicity-mediated death of retinal ganglion cells, *PLoS One* 6, e18305.
289. Khurgel, M., Koo, A. C., and Ivy, G. O. (1996) Selective ablation of astrocytes by intracerebral injections of alpha-aminoadipate, *Glia* 16, 351-358.
290. Pederson, J. E. (1994) Fluid physiology of the subretinal space, *In: Wilkinson, C.P. (Ed.), Retina. Mosby-Year Book Inc., St. Louis, pp. 1955–1968.*
291. Bialek, S., and Miller, S. S. (1994) K⁺ and Cl⁻ transport mechanisms in bovine pigment epithelium that could modulate subretinal space volume and composition, *J Physiol* 475, 401-417.
292. Newman, E., and Reichenbach, A. (1996) The Muller cell: a functional element of the retina, *Trends Neurosci* 19, 307-312.
293. Uckermann, O., Kutzera, F., Wolf, A., Pannicke, T., Reichenbach, A., Wiedemann, P., Wolf, S., and Bringmann, A. (2005) The glucocorticoid triamcinolone acetonide inhibits osmotic swelling of retinal glial cells via stimulation of endogenous adenosine signaling, *J Pharmacol Exp Ther* 315, 1036-1045.
294. Davidge, S. T., Baker, P. N., Laughlin, M. K., and Roberts, J. M. (1995) Nitric oxide produced by endothelial cells increases production of eicosanoids through activation of prostaglandin H synthase, *Circ Res* 77, 274-283.
295. Landino, L. M., Crews, B. C., Timmons, M. D., Morrow, J. D., and Marnett, L. J. (1996) Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15069-15074.
296. Lees, G. J. (1991) Inhibition of sodium-potassium-ATPase: a potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology, *Brain Res Brain Res Rev* 16, 283-300.
297. Owada, S., Larsson, O., Arkhammar, P., Katz, A. I., Chibalin, A. V., Berggren, P. O., and Bertorello, A. M. (1999) Glucose decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity in pancreatic beta-cells. An effect mediated via Ca²⁺-independent phospholipase A2 and protein kinase C-dependent phosphorylation of the alpha-subunit, *J Biol Chem* 274, 2000-2008.
298. Bringmann, A., Skatchkov, S. N., Biedermann, B., Faude, F., and Reichenbach, A. (1998) Alterations of potassium channel activity in retinal Muller glial cells induced by arachidonic acid, *Neuroscience* 86, 1291-1306.
299. Chao, T. I., Henke, A., Reichelt, W., Eberhardt, W., Reinhardt-Maelicke, S., and Reichenbach, A. (1994) Three distinct types of voltage-dependent K⁺ channels are expressed by Muller (glial) cells of the rabbit retina, *Pflugers Arch* 426, 51-60.
300. Uckermann, O., Wolf, A., Kutzera, F., Kalisch, F., Beck-Sickinger, A. G., Wiedemann, P., Reichenbach, A., and Bringmann, A. (2006) Glutamate release by neurons evokes a purinergic inhibitory mechanism of osmotic glial cell swelling in the rat retina: activation by neuropeptide Y, *J Neurosci Res* 83, 538-550.
301. Watanabe, M., Sawai, H., and Fukuda, Y. (1997) Survival of axotomized retinal ganglion cells in adult mammals, *Clin Neurosci* 4, 233-239.
302. Harada, C., Guo, X., Namekata, K., Kimura, A., Nakamura, K., Tanaka, K., Parada, L. F., and Harada, T. (2011) Glia- and neuron-specific functions of TrkB signalling during retinal degeneration and regeneration, *Nat Commun* 2, 189.
303. Saito, T., Abe, T., Wakusawa, R., Sato, H., Asai, H., Tokita-Ishikawa, Y., and Nishida, K. (2009) TrkB-T1 receptors on Muller cells play critical role in brain-
-

- derived neurotrophic factor-mediated photoreceptor protection against phototoxicity, *Curr Eye Res* 34, 580-588.
304. Zhang, M., Mo, X., Fang, Y., Guo, W., Wu, J., Zhang, S., and Huang, Q. (2009) Rescue of photoreceptors by BDNF gene transfer using in vivo electroporation in the RCS rat of retinitis pigmentosa, *Curr Eye Res* 34, 791-799.
305. Layer, P. G. (1991) Cholinesterases during development of the avian nervous system, *Cell Mol Neurobiol* 11, 7-33.
306. Vogel-Hopker, A., Sperling, L. E., and Layer, P. G. (2012) Co-opting functions of cholinesterases in neural, limb and stem cell development, *Protein Pept Lett* 19, 155-164.
307. Nagahara, A. H., Merrill, D. A., Coppola, G., Tsukada, S., Schroeder, B. E., Shaked, G. M., Wang, L., Blesch, A., Kim, A., Conner, J. M., Rockenstein, E., Chao, M. V., Koo, E. H., Geschwind, D., Masliah, E., Chiba, A. A., and Tuszynski, M. H. (2009) Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease, *Nat Med* 15, 331-337.
308. Alderson, R. F., Alterman, A. L., Barde, Y. A., and Lindsay, R. M. (1990) Brain-derived neurotrophic factor increases survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture, *Neuron* 5, 297-306.
309. Kitiyanant, N., Kitiyanant, Y., Svendsen, C. N., and Thangnipon, W. (2012) BDNF-, IGF-1- and GDNF-secreting human neural progenitor cells rescue amyloid beta-induced toxicity in cultured rat septal neurons, *Neurochem Res* 37, 143-152.
310. Burgess, A., and Aubert, I. (2006) Polysialic acid limits choline acetyltransferase activity induced by brain-derived neurotrophic factor, *J Neurochem* 99, 797-806.
311. Dai, M., Xia, X. B., and Xiong, S. Q. (2012) BDNF regulates GLAST and glutamine synthetase in mouse retinal Muller cells, *J Cell Physiol* 227, 596-603.
312. Shen, X., Xie, B., Cheng, Y., Jiao, Q., and Zhong, Y. (2011) Effect of pigment epithelium derived factor on the expression of glutamine synthetase in early phase of experimental diabetic retinopathy, *Ocul Immunol Inflamm* 19, 246-254.
313. Shen, X., Zhong, Y., Xie, B., Cheng, Y., and Jiao, Q. (2010) Pigment epithelium derived factor as an anti-inflammatory factor against decrease of glutamine synthetase expression in retinal Muller cells under high glucose conditions, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 248, 1127-1136.
314. Zhu, D., Xu, X., Zheng, Z., and Gu, Q. (2009) Regulation of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor in rat retinal explants under retinal acidification, *Eye (Lond)* 23, 2105-2111.

Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden zur Veröffentlichung eingereicht:

Publikation

Gopenath Thangaraj, Alexander Greif, Paul G. Layer (2011) Simple explant culture of the embryonic chicken retina with long-term preservation of photoreceptors Experimental Eye Research, Exp Eye Res.93, 556-564.

Julia Wiedemann, Alexander Greif, Gopenath Thangaraj, Paul. G. Layer (2012) Network-wide actions of BDNF in a ganglion cell-free explant system of the embryonic chick retina (under review).

Alexander Greif, Jeanette Christophel, Gopenath Thangaraj and Paul G. Layer (2013) Direct counteractions of PEDF expression and DL- α -amino adipate toxicity: PEDF rescues gliotic damages of outer and inner cells in RPE-free chicken retinal explants (under review).

Poster

Alexander Greif, Julia Wiedemann, Gopenath Thangaraj, Paul. G. Layer (2012) BDNF and forskolin act retina-internally in a ganglion cell-free novel explant system of the chick embryo, Arvo Florida.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Alexander Greif
Geboren	08. September 1980 in Hagen
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

Promotion

Dez. 2008 – Nov. 2012	Dissertation am Institut für Zoologie der TU-Darmstadt unter Prof. Dr. Paul Layer. Thema: „Wirkungen relevanter Zytokine auf Müllersche Radialgliazellen in der embryonalen Hühnchenretina unter normalen und Stressbedingungen. Ein Beitrag zum Verständnis der retinalen Gliose“.
Okt. 2007 – Aug. 2008	Masterarbeit am Institut für Physiologische Chemie Abteilung für Systembiochemie der Ruhr Universität Bochum Thema: “Morphological screening of yeast strains with oleat growth defect and characterisation of newly identified strains with peroxisomal importdefects”
Jan. 2006 – Aug. 2006	Bachelorarbeit FH Gelsenkirchen Thema: „VPR-MBP: Optimierung von Klonierung und Expression auf dem Weg zum löslichen Protein“
Seit Okt. 2003	Studium Molekulare Biologie an der FH-Gelsenkirchen

Berufliche Ausbildung

Aug. 2001 – Jun. 2003	Abschluss zum Biologischen-technischen Assistenten (BTA) an der Rheinischen Akademie Köln
-----------------------	---

Schulische Ausbildung

Jun. 2001	Abitur an der Rudolf Steiner Schule, Witten
-----------	---

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und noch nicht veröffentlicht.

Darmstadt, den 2012

Alexander Greif